

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Daniel Teupser

# **Stimulierung der Faktor Xa-Bildung und Aktivierung von Tissue Factor durch Proteine des endoplasmatischen Retikulums in vitro**



**Dissertation**  
**zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin**  
**an der Medizinischen Fakultät der**  
**Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von  
Florian Johann Oberndörfer  
aus  
München  
2018

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Bernd Engelmann

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Simon Schäfer  
Prof. Dr. med. Michael Spannagl  
Prof. Dr. med. Peter Bartenstein

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Oktober 2018

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>1</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>2</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>4</b>
<b>WIDMUNG .....</b>	<b>6</b>
<b>I EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>I.1 HÄMOSTASE .....</b>	<b>7</b>
<b>I.1.1 PHYSIOLOGIE DER EXTRINSISCHEN HÄMOSTASE.....</b>	<b>7</b>
<b>I.1.2 KONTROLLMECHANISMEN DER HÄMOSTASE.....</b>	<b>9</b>
<b>I.2 TF.....</b>	<b>11</b>
<b>I.2.1 VORKOMMEN UND VERTEILUNG IM MENSCHLICHEN ORGANISMUS.....</b>	<b>11</b>
<b>I.2.2 STRUKTURELLER AUFBAU VON TF .....</b>	<b>12</b>
<b>I.2.3 AUFGABEN UND FUNKTION.....</b>	<b>13</b>
<b>I.2.4 AKTIVIERUNG VON TF.....</b>	<b>14</b>
<b>I.3 DER PLC .....</b>	<b>15</b>
<b>I.4 ZIEL DER FORSCHUNGSARBEIT .....</b>	<b>19</b>
<b>II MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>20</b>
<b>II.1 MATERIAL .....</b>	<b>20</b>
<b>II.1.1 GERÄTE.....</b>	<b>20</b>
<b>II.1.2 VERBRAUCHSMATERIAL.....</b>	<b>20</b>
<b>II.1.3 CHEMIKALIEN, REAGENZIEN UND SUBSTRATE .....</b>	<b>21</b>
<b>II.1.4 PUFFER UND LÖSUNGEN .....</b>	<b>22</b>
<b>II.1.5 ANTIKÖRPER UND PROTEINE .....</b>	<b>23</b>
<b>II.1.6 ZELLKULTURMEDIENTEN .....</b>	<b>24</b>
<b>II.1.7 ZELLINIEN.....</b>	<b>25</b>
<b>II.2 METHODEN .....</b>	<b>26</b>
<b>II.2.1 GRUNDSÄTZLICHER VERSUCHSAUFBAU.....</b>	<b>26</b>
<b>II.2.2 TF.....</b>	<b>26</b>
<b>II.2.3 ZELLKULTUR.....</b>	<b>26</b>
<b>II.2.3.1 Durchführung der Zellkultur .....</b>	<b>26</b>
<b>II.2.3.2 Spezielle Zellkulturbedingungen der verschiedenen Zelllinien.....</b>	<b>27</b>
<b>II.2.3.3 Zählen der Zellen.....</b>	<b>28</b>
<b>II.2.4 LYSATHERSTELLUNG.....</b>	<b>28</b>
<b>II.2.5 MONOZYTENISOLATION UND MONOZYTENSTIMULATION .....</b>	<b>29</b>
<b>II.2.6 FAKTOR XA-BILDUNG IM TWO-STAGE-ASSAY.....</b>	<b>30</b>
<b>II.2.6.1 Antikörperhemmversuche.....</b>	<b>30</b>
<b>II.2.6.2 Versuche mit defizienten Zellen .....</b>	<b>30</b>
<b>II.2.6.3 pH-Versuche .....</b>	<b>31</b>
<b>II.2.6.4 Temperaturversuche .....</b>	<b>31</b>

II.2.7 PROTEINMESSUNG .....	31
II.2.8 AUSWERTUNG UND STATISTIK .....	32
<b>III ERGEBNISSE.....</b>	<b>33</b>
III.1 AKTIVITÄTSZUNAHME VON TF DURCH ZELLYSATSTIMULATION.....	33
III.2 PDI-ANALOGA UND TF-AKTIVIERUNG .....	40
III.2.1 PDI UND ERp57 .....	40
III.2.2 ERp27 UND MUTANTEN .....	44
III.3 PROTEINE DES PLC UND TF-AKTIVIERUNG .....	45
III.3.1 B2M.....	52
III.3.2 TAPASIN.....	54
III.3.3 MHC KLASSE I .....	54
III.4 AUSWIRKUNG VON PH-WERT UND TEMPERATUR AUF DIE TF-AKTIVIERUNG .....	56
<b>IV DISKUSSION .....</b>	<b>58</b>
IV.1 STIMULIERUNG DER PROKOAGULATORISCHEN AKTIVITÄT VON TF DURCH ZELLYSATE .....	58
IV.2 PDI UND PDI-ANALOGA ALS TF-AKTIVATOREN .....	59
IV.3 ROLLE DES PLC BEI DER POSTTRANSLATIONALEN TF-AKTIVIERUNG .....	59
IV.4 PHYSIKALISCHE EINFLÜSSE AUF DIE TF-AKTIVIERUNG .....	61
IV.5 KRITISCHE AUSEINANDERSETZUNG MIT DEN ANGEWANDTEN METHODEN .....	61
IV.6 AUSBLICK.....	61
<b>V ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>62</b>
<b>VI SUMMARY .....</b>	<b>63</b>
<b>VII LITERATUR .....</b>	<b>64</b>
<b>VIII DANKSAGUNG .....</b>	<b>73</b>
<b>IX ANHANG .....</b>	<b>74</b>
IX.1 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	74

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die plasmatische Hämostase .....	7
Abbildung 2: TF-Expression in menschlichen Organen.....	12
Abbildung 3: Der PLC .....	16
Abbildung 4: PDI-Familienmitglieder PDI, ERp57 und ERp27.....	18
Abbildung 5: Prokoagulatorische Aktivitäten von TF-Proteinen bzw. TF-exprimierender Zellen in der Xa-Bildung.....	33

Abbildung 6: Stimulierung der FXa-Bildung durch sTF214 in Gegenwart von CHO-Zelllysat.....	34
Abbildung 7: Stimulierung der FXa-Bildung durch sTF214 in Gegenwart von HUVEC-Zelllysat.....	35
Abbildung 8: Stimulierung der FXa-Bildung durch sTF218 in Gegenwart von CHO- und HUVEC- Lysaten .....	36
Abbildung 9: Stimulierung von fITF in Gegenwart von CHO- und HUVEC-Lysat in der FXa-Bildung .....	37
Abbildung 10: Hemmung der FXa-Bildung durch anti-TF-Antikörper.....	38
Abbildung 11: Stimulierung der FXa-Bildung durch aktivierte, intakte Monozyten und HUVEC-Zelllysat .....	39
Abbildung 12: Hemmung der Stimulierung von sTF214 durch anti-PDI-Antikörper .....	40
Abbildung 13: Hemmung der Stimulierung von sTF218 durch anti-PDI-Antikörper .....	41
Abbildung 14: Hemmung der Stimulierung von sTF214 durch anti-ERp57-Antikörper.....	42
Abbildung 15: Hemmung der Stimulierung von sTF218 durch anti-ERp57-Antikörper.....	43
Abbildung 16: Wirkung von ERp27 auf die TF-Aktivität in der FXa-Bildung.....	44
Abbildung 17: Wirkung eines polyklonalen anti-CNX-Antikörpers auf die prokoagulatorische Aktivität von Monozyten .....	45
Abbildung 18: Hemmung der Stimulierung von sTF218 durch anti-CNX-Antikörper .....	46
Abbildung 19: Hemmung der Stimulierung von sTF218 durch anti-CNX-Antikörper .....	46
Abbildung 20: Hemmung der Stimulierung von sTF214 durch anti-CNX-Antikörper .....	47
Abbildung 21: Einfluss der sCNX-exprimierenden MEF-Zellen prokoagulatorische Aktivität von sTF218 .....	48
Abbildung 22: Hemmung der Stimulierung von sTF218 in Anwesenheit eines Antikörpers gegen die zytoplasmatische Domäne von CNX.....	49
Abbildung 23: Vergleich CRT-defizienter MEF mit Wildtypzellen .....	50
Abbildung 24: Hemmung der Stimulierung von sTF218 durch Kombination von anti-CNX plus anti- ERp57 .....	51
Abbildung 25: Wirkung des anti-B2M-Antikörpers auf die sTF-Aktivität in Gegenwart von HUVEC- Lysaten .....	52
Abbildung 26: Analyse der prokoagulatorischen B2M-defizienter Daudi-Zellen .....	53
Abbildung 27: Analyse der prokoagulatorischen Aktivität Tapasin-defizienter LCL.220B*4402-Zellen	54
Abbildung 28: Analyse der prokoagulatorischen Aktivität HLA-A2-defizienter K562-Zellen .....	55
Abbildung 29: Temperaturabhängigkeit der prokoagulatorischen Aktivität von sTF218 und THP-1....	56
Abbildung 30: pH-Abhängigkeit der prokoagulatorischen Aktivität von sTF218 und THP-1.....	57

# Abkürzungsverzeichnis

Asp Asparaginsäure

B2M beta-2-Mikroglobulin

Ca<sup>2+</sup> Calcium

CHO Chinese Hamster Ovary

CNX Calnexin

CRT Calreticulin

Cys Cystein

DNA Desoxyribonukleinsäure

flTF Full length Tissue Factor

FII Faktor II

FIIa Aktivierter Faktor II

FV Faktor V

FVa Aktivierter Faktor V

FVII Faktor VII

FVIIa Aktivierter Faktor VII

FVIII Faktor VIII

FIX Faktor IX

FIXa Aktivierter Faktor IX

FX Faktor X

FXa Aktivierter Faktor X

FXIa Aktivierter Faktor XI

FXIIa Aktivierter Faktor XII

HUVEC Human Umbilical Vein Endothelial Cell

Ile Isoleucin

kb Kilobase

kDa Kilodalton

LDL Low density Lipoprotein

LPS Lipopolysaccharid

Lys Lysin

MEF Mouse Embryonal Fibroblast

Met Methionin  
MHC I Major Histocompatibility Complex Type I  
ml Milliliter  
 $\mu$ l Mikroliter  
mM Millimolar  
mRNA Messenger Ribonukleinsäure  
mU Milliunit  
ng Nanogramm  
PDI Protein Disulfid Isomerase  
PLC Peptide-Loading Complex  
RNA Ribonukleinsäure  
RT Raumtemperatur  
sCNX Short Calnexin  
S.D. Standardabweichung  
S.E.M. Standardfehler des Mittelwertes  
Ser Serin  
sTF Soluble Tissue Factor  
TF Tissue Factor  
Tyr Tyrosin  
U Unit  
W Watt  
 $\text{Zn}^{2+}$  Zink

# **Widmung**

Meiner Familie





FVIIa entsteht durch Autokatalyse und macht etwa 1% der FVII-Gesamtmenge im Plasma aus (Morrissey JH et al. 1993). TF und FVIIa bilden den Aktivatorkomplex (extrinsische Xase), der drei natürliche Substrate hat: Er aktiviert die Vitamin-K abhängigen Faktoren X (FX) und IX (FIX), sowie FVII selbst. FVII und FVIIa aktivieren FX  $2 \cdot 10^7$ -fach stärker mit TF als ohne TF (Butenas S et al. 2002). Der TF/FVII-Komplex vermittelt die Bildung von FVIIa. Zusätzlich kann Faktor Xa (FXa) auch alleine FVII aktivieren. Dies ermöglicht eine auf die Gefäßverletzung fokussierte Aktivierung von Gerinnungsfaktoren, weil FVIIa lokal in einer erhöhten Konzentration bereitgestellt wird (Ott I 2011; Fiore MM et al. 1993).

Den TF-abhängigen Teil der FX-Aktivierung bezeichnet man als extrinsischen - durch die Gefäßwand ausgelöst - Weg der Hämostase (Mackman N et al. 2007). Über die Aktivierung von Faktor IX in Faktor IXa (FIXa) greift der Initiator-Komplex in den intrinsischen Weg der Hämostase ein. In der Tat induziert der Komplex aus FIXa und Faktor VIIIa (FVIIIa) (intrinsische Xase) die FX-Aktivierung ebenfalls durch limitierte Proteolyse. Hierdurch kommt es zu einer 50-mal höheren FX-Aktivierung als durch den Initiator-Komplex (Butenas S et al. 1997). Die Bildung des intrinsischen Xase-Komplexes wird durch Phospholipide, vor allem Phosphatidylserin, und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen stabilisiert (Zwaal RF et al. 1998; Morrissey JH et al. 2009). Dieser Verstärkungsweg für die FXa-Bildung ist bei einem X-chromosomal-rezessiv vererbten FVIII- oder FIX-Mangel gestört und kann daher bei Patienten mit Hämophilie A oder B schon in der frühen Kindheit zu schweren Muskel- und Gelenkeinblutungen führen.

Gemeinsam mit Faktor Va (FVa) bildet FXa unter erneuter Stabilisierung durch Phospholipide und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen den Prothrombinasekomplex. Initial setzt er nur eine kleine, pikomolare Menge Prothrombin zur Serinprotease Thrombin um (Brummel KE 2002). Thrombin aber erhöht seine eigene Konzentration durch die Aktivierung der vorgeschalteten Gerinnungsfaktoren Faktor V (FV), FVIII und Faktor XI (FXI) im Sinne von positiven Rückkopplungsschleifen. Außerdem komplettiert es die Thrombozytenaktivierung über den Protease-aktivierten Rezeptor 1 (PAR1) (Butenas S et al. 2002; Keuren JF 2005).

Die zentrale Aufgabe von Thrombin besteht in der Abspaltung der beiden Fibrinopeptide A und B von Fibrinogen. Die so entstandenen Fibrinmonomere werden zunächst nur durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbildung als Protofibrillen zusammengehalten (Hermans J et al. 1982). Gleichzeitig aktiviert Thrombin den fibrinstabilisierenden Faktor XIII (FXIII) zu Faktor XIIIa (FXIIIa), der als eine Transglutaminase

ein stabiles und unlösliches Fibrinpolymer durch kovalente  $\epsilon$ - $\gamma$ -Glutamyllysin-Isopeptidbindungen ausbildet (Siebenlist KR et al. 2005).

Alternativ kann Thrombin auch über die Aktivierung von Faktor XII (FXII, Hagemann-Faktor) entstehen, der das Kontaktsystem der Blutgerinnung stimuliert und darüber den intrinsischen Gerinnungsweg aktiviert. Faktor XIIa (FXIIa) entsteht zu einem kleinen Teil autokatalytisch und wird hauptsächlich durch die Serinprotease Kallikrein gebildet. Darüber hinaus kann auch eine Kontaktaktivierung mit negativ geladenen Oberflächen wie Polyphosphaten aus Thrombozyten, RNA und DNA-Histon-Komplexen stattfinden (Brinkmann V et al. 2004; Ashish N Rao et al. 2015; Müller F et al. 2009; Ruiz FA et al. 2004). In einem Rückkopplungsmechanismus kann FXIIa Präkallikrein zu Kallikrein spalten, welches wiederum FXII aktiviert. Über die nachfolgende Bildung von FXIa und FIXa münden der intrinsische und extrinsische Gerinnungsweg in die Aktivierung von FX. Die physiologische Bedeutung des Kontaktsystems ist unklar, da Organismen mit einem selektiven FXII-Mangel keinen Phänotyp mit erhöhter Blutungsneigung zeigen (Woodruff RS et al. 2011). Diskutiert wird unter anderem eine Beteiligung bei der Bildung von Thrombosen (Girolami A et al. 2004; Renné T et al. 2005) und der Aktivierung von Plasminogen (Kluft C et al. 1987).

### **I.1.2 Kontrollmechanismen der Hämostase**

Nach einer Verletzung muss das Blut abgesehen von der Verletzung flüssig bleiben, da eine Gefäßokklusion verhindert werden muss, die eine Gewebischämie induzieren kann. Zugleich ist ein zuverlässiger Verschluss des Gefäßlecks unabdingbar, um einen lebensgefährlichen Blutverlust zu verhindern. Deswegen ist die Hämostase ein komplex regulierter Prozess mit subtilen Kontrollmechanismen.

Bindet Thrombin äquimolar an das endotheliale Transmembranprotein Thrombomodulin (TM), so kann dieser dimere Komplex Protein C (PC) bis zu 1500-fach, in Gegenwart von Phospholipidmembranen sogar bis 10000-fach, stärker aktivieren als Thrombin allein. Thrombin hat eine weitaus höhere Affinität zu TM als zu Fibrinogen, weswegen sich im Verlauf der Hämostase seine Hauptaufgabe von einem prokoagulatorischen zu einem antikoagulatorischen Enzym verschiebt (Salem HH et al. 1984; Lane DA et al. 2005). Das nach Abspaltung eines Dodekapeptids aus Protein C aktivierte Protein C (aPC) inaktiviert die Kofaktoren der Gerinnungskaskade FVa und FVIIIa, was eine verminderte Thrombinbildung zur Folge hat. Bei der autosomal-rezessiv vererbten Faktor-V-Leiden-Mutation kann aPC

aufgrund einer Punktmutation FV nicht mehr ausreichend proteolytisch spalten. Die so entstandene Resistenz des FVa gegen seinen proteolytischen Abbau durch aPC (APC-Resistenz) führt bei den Betroffenen zu thrombembolischen Komplikationen (Kujovich JL 2011).

Der Kofaktor Protein S, der in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eine stärkere Bindung von aPC an Membranphospholipide vermittelt, stellt eine enge Interaktion mit FVa und FVIIIa her und verstärkt deren proteolytische Degradation (Danese S et al. 2010; Andersson HM et al. 2010). Außerdem scheint Protein S eine aktivierende Funktion auf den Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) zu haben, um somit dessen Funktion als Inhibitor des extrinsischen Initiator-Komplexes TF-FVIIa zu verstärken (Hackeng TM et al. 2006). TFPI wird hauptsächlich von Gefäßendothelzellen gebildet und dort zu 80% gebunden. In seiner physiologischen Funktion hemmt die Kunitz-Typ Protease TFPI den Aktivator-Komplex unter Bildung eines Dimers mit FXa, der sich anschließend mit TF und FVIIa zum aktiven Heterotetramer komplettiert (Kasthuri RS et al. 2010). Dabei geht die erste der drei Kunitz-Domänen eine Verbindung mit FVIIa, die zweite mit FXa ein (Morrissey JH 2001).

Auch Antithrombin, ein Serpin, wirkt bedingt durch die Hemmung von Thrombin und FXa antikoagulatorisch. Bedeutsam ist diese Eigenschaft von Antithrombin in der Klinik dadurch, dass seine Aktivität durch Heparine vertausendfacht wird und so in der Prophylaxe und Therapie der tiefen Beinvenenthrombose und Lungenembolie eingesetzt werden kann (Rodgers GM 2009; Patnaik MM und Moll S 2008).

## **I.2 TF**

### **I.2.1 Vorkommen und Verteilung im menschlichen Organismus**

Als ein zentraler Initiator des extrinsischen Gerinnungsweges ist TF in stark vaskularisierten Geweben und Organkapseln exprimiert, wo er eine prokoagulatorische Schutzhülle bildet (Butenas S et al. 2009). Das größtenteils subendothelial lokalisierte Glykoprotein, dessen Genlokus sich auf Chromosom 1 p21-p22 befindet (Kao FT et al. 1988), kommt normalerweise nicht mit dem Blut in Kontakt. Ein Hauptexpressionsort stellen Fibroblasten der Adventitia dar (Wilcox JN et al. 1989). Es wird physiologischerweise nicht in Endothelzellen exprimiert. Jedoch können auch Endothelzellen unter gewissen Bedingungen TF synthetisieren. So zeigen sie unter dem Einfluss von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Histamin, Thrombin und oxidiertem LDL erhöhte TF-Aktivitäten (Breitenstein A et al. 2010). Periphere Blutzellen wie Lymphozyten und Erythrozyten zeigen keine TF-Aktivität (Drake TA et al. 1989). Dagegen sind periphere Blutmonozyten in der Lage, TF nach Stimulation mit bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) zu synthetisieren und auf ihrer Zellmembran zu präsentieren (Drake TA et al. 1989). Inaktive Thrombozyten besitzen pre-mRNA für TF, die bei Aktivierung in reife mRNA gespleißt und dann translatiert wird (Schwertz H et al. 2006). So könnte sich auch das Vorkommen von TF auf thrombozytären Mikropartikeln erklären (Müller I et al. 2003). Dabei handelt es sich um Plasmamembranvesikel, die in humanem Blut zu 70 – 90% von Thrombozyten abstammen und bei Zellaktivierung und Apoptose in den Blutstrom freigegeben werden. Mikropartikel kommen dennoch bei gesunden Individuen vor, sind aber in erhöhter Konzentration bei verschiedenen Erkrankungen vorzufinden. Erhöhte Mikropartikel-Level im Blut gehen mit einem gesteigerten thrombembolischen Risiko und einem reduzierten Überleben bei Tumorerkrankungen einher (Flaumenhaft R et al. 2009; Morel O et al. 2006; Cimmino G et al. 2011; Geddings JE et al. 2016; Hisada Y et al. 2018).

Verschiedene Organe zeigen eine unterschiedliche TF-Expression (Abb. 2). So werden beispielsweise Gehirn, Plazenta, Niere und Herz durch eine erhöhte TF-Expression vor bedrohlichem Blutverlust besonders abgesichert.

Organ	Organteil	Expressionsgrad
<b>Haut</b>	Epidermis	+++
	Dermis	-
<b>Darm</b>	Mucosa	+++
	Submucosa	-
<b>Gefäße</b>	Intima	-
	Media	V (+)
	Adventitia	++
<b>Herz</b>	Myokard	+++
	Endokard	-
<b>Lunge</b>	Mucosa	++
	Submucosa	-
<b>Gehirn</b>	Kortex	+++
<b>Niere</b>	Glomeruli	+++
<b>Skelettmuskulatur</b>	Myozyten	-
<b>Leber</b>	Hepatozyten	+
	Gallengangsepithel	-

**Abbildung 2: TF-Expression in menschlichen Organen**

-, keine; +, schwache; ++, moderate; +++, starke Expression; V, variable Expression, Stärke der Expression, wenn vorhanden, in Klammern (modifiziert nach Drake TA et al. 1989)

Neben dem Konzept des parenchymgebundenen TF hat sich auch das des intravaskulären TF, dem sogenannten *blood borne TF*, durchgesetzt. So konnte TF in neutrophilen und eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden (Moosbauer C et al. 2007; Maugeri N und Manfredi AA 2015).

### **I.2.2 Struktureller Aufbau von TF**

Das Typ-1 Transmembranprotein TF ist ein 47 kDa Glykoprotein und besteht aus einer Polypeptidkette mit 263 Aminosäuren. Die Aminosäuren 1-219 bilden den extrazellulären N-Terminus, 220-242 die Transmembrandomäne und 243-263 den zytosolischen C-Terminus (Daubie V et al. 2007). Der extrazelluläre Anteil umfasst zwei Fibronectin-Typ-III-Domänen, die gelenkartig miteinander verbunden sind. Sie kommen typischerweise in extrazellulären Proteinen, Enzymen und Adhäsionsproteinen vor (Steward A et al. 2002). Das Protein weist zudem eine enge Homologie zu Interferon- $\gamma$ -Rezeptoren auf, weshalb es als Klasse-II-Typ

Zytokinrezeptor klassifiziert wird. Die extrazelluläre Domäne kann an drei Stellen N-glykosyliert sein. Außerdem besitzt sie die beiden Disulfidbrücken Cys<sup>49</sup>-Cys<sup>57</sup> und Cys<sup>186</sup>-Cys<sup>209</sup>. Der Carboxyterminus besitzt ein einziges Cystein, Cys<sup>245</sup>, das mit einem Palmitinsäure- oder Stearinsäurerest assoziiert ist und das stabilisierende Funktionen durch eine verbesserte Membranverankerung erfüllt. Außerdem hat TF drei Serinreste, von denen Ser<sup>253</sup> durch die Proteinkinase Cα und Ser<sup>258</sup> durch die *Proline-directed*-Kinase phosphoryliert werden kann. Die erste Phosphorylierung wird durch die zweite bedingt. Wird Cys<sup>245</sup> mutiert, so kommt es aufgrund der fehlenden Palmitoylierung zu einer verstärkten Phosphorylierung von Ser<sup>258</sup> (Versteeg HH und Ruf W 2006; Harlos K et al. 1994; Butenas S et al. 2009, Eilertsen KE und Østerud B 2004, Dorfleutner A und Ruf W 2003).

Neben dem membranständigen TF ist darüber hinaus noch eine natürliche, im Plasma lösliche Isoform bekannt, die ein alternatives Spleißprodukt des 12,4 kb F3-Gens auf Chromosom 1 darstellt. Bei diesem sogenannten *alternatively spliced human TF* (asHTF), der die zweite Quelle für intravaskulären TF darstellt, wird das Exon 6 direkt an das Exon 4 gespleißt (Bogdanov VY et al. 2003). Das die transmembranöse Domäne enthaltende Exon 5 entfällt, worauf ein lösliches Protein entsteht, das 206 Aminosäuren umfasst und in seinen ersten 166 Aminosäuren der extrazellulären Domäne von TF entspricht. Die prokoagulatorische Funktion von asHTF ist fraglich.

### **1.2.3 Aufgaben und Funktion**

Die Hauptaufgabe von TF liegt in der Funktion als essentieller Kofaktor von FVII/FVIIa bei der Hämostase. TF positioniert FVII/FVIIa und fungiert dadurch als allosterischer Aktivator (Rand KD et al. 2006), hat aber eine höhere Affinität zu FVIIa als zu FVII. FVIIa erlangt seine volle proteolytische Aktivität durch die Anlagerung an TF, verweilt also zunächst in einem zymogenähnlichen Zustand. Das einkettige Zymogen FVII wird bei der Aktivierung in eine leichte und eine das katalytische Zentrum tragende schwere Kette mit neuem N-Terminus überführt. Nur durch die Interaktion mit TF gelingt aber die für seine Aktivität essentielle Bildung einer intramolekularen Verbindung von Ile<sup>153</sup> und Asp<sup>343</sup> in der Aktivierungstasche von FVIIa. Durch diese Kofaktorabhängigkeit nimmt FVII eine Sonderstellung in der Familie der trypsinähnlichen Serinproteasen ein, in denen diese Aktivierung typischerweise spontan abläuft (Olsen OH et al. 2007; Olsen OH et al. 2008; Minazzo AS et al. 2009).

Außerdem kontaktiert der N-terminale Anteil von TF die proteolytische Domäne von FVIIa und vermindert deren Flexibilität. Dabei richtet er diese den Zielsubstraten entgegen, indem das katalytische Zentrum möglichst weit von der Membranverankerung absteht (McCallum CD et al. 1996; Kirchhofer D et al. 2000). Stabilisierung erfährt der binäre Komplex aus der Bindung an die erste *Epidermal-Growth-Factor*-Domäne (EGF1) von TF und der  $\gamma$ -Glutaminsäure-Domäne von FVIIa (Osterlund M et al. 2005).

Durch seine Strukturhomologie zu Interferonrezeptoren kann TF nicht nur als Kofaktor zur Hämostase agieren, sondern auch als echter Rezeptor mit intrazellulärer Signaltransduktion. Darauf weisen auch die beiden zytoplasmatischen Phosphorylierungsstellen hin. So konnte einerseits gezeigt werden, dass FVIIa nur in Anwesenheit von TF in der Lage ist, den proinflammatorisch wirkenden G-Protein gekoppelten Protease-aktivierten Rezeptor 2 (PAR2) zu aktivieren (Camerer E et al. 2000; Coughlin SR et al. 2003). Andererseits übt der intrazelluläre Carboxyterminus kontrollierende Funktionen auf PAR2 aus. Denn ist der zytoplasmatische Anteil deletiert, so kommt es zu einer beschleunigten Angiogenese. Dieser TF-PAR2 Signalweg soll bei einer Verletzung die vaskuläre Integrität in Gegenwart von Zytokinen und Entzündungsmediatoren wiederherstellen. PAR2 induziert auch die Phosphorylierung von TF, wodurch die angiogene Funktion in Gang gesetzt wird (Belting M et al. 2004).

#### **I.2.4 Aktivierung von TF**

Nach heutiger Auffassung liegt das TF-Molekül in zwei funktionell unterschiedlichen Zuständen vor. Als *encrypted* TF bezeichnet man die koagulatorisch unwirksame Form, wohingegen *decrypted* TF gerinnungsaktiv ist. Dabei spielt das intramolekulare Cysteinpaar Cys<sup>186</sup>-Cys<sup>209</sup> eine zentrale Rolle. Im reduzierten Zustand mit freien Thiolen an Cys<sup>186</sup> und Cys<sup>209</sup> verliert TF seine prokoagulatorische Potenz, behält aber seine Signalfunktionen. Die Oxidation zur Disulfidbrücke erfolgt nach Zellschädigung beispielsweise durch die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), einer Oxidoreduktase des endoplasmatischen Retikulums (ER), und führt zur TF-Aktivierung (Reinhardt C et al. 2008).

Da PDI normalerweise intrazellulär lokalisiert ist, liegt der Verdacht nahe, dass bei einer Zellschädigung, wie sie schon bei einer Bagatellverletzung auftritt, das Protein aus seinem ursprünglichen Funktionsbereich herausgelöst wird. So kommt dessen katalytische oder allosterische Aktivität in Kontakt mit neuen Interaktionspartnern. Im Gedankenmodell ist die



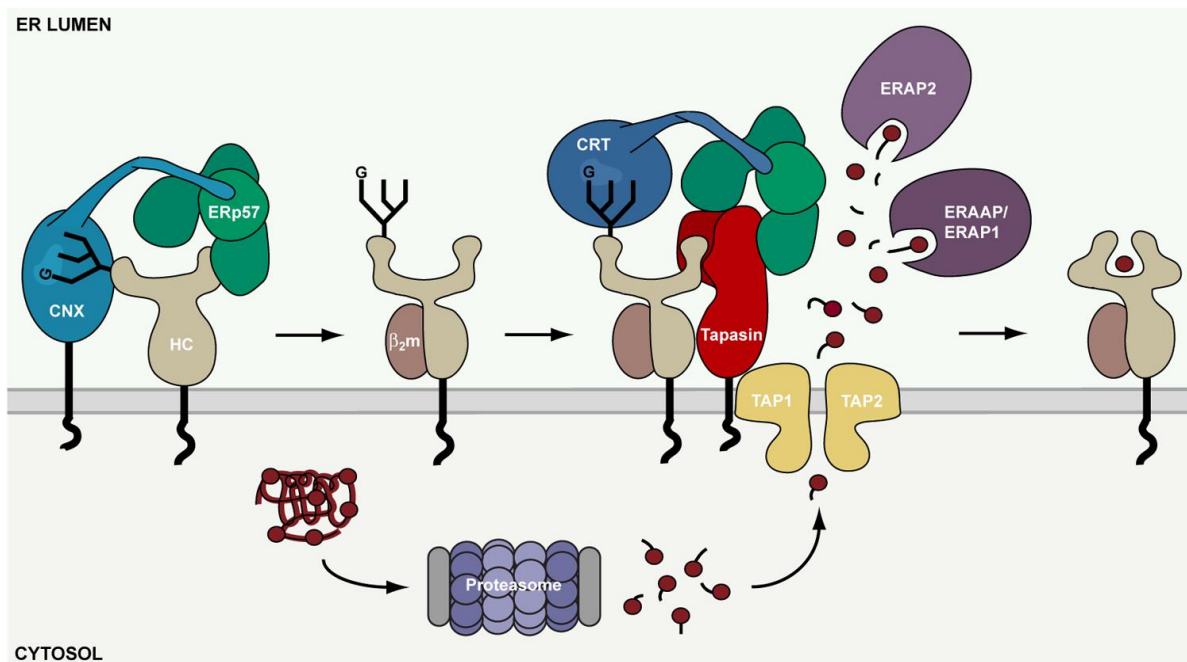
Einzelzelle zwar verloren, aber ihre Ausstattung an Proteinen, Nukleinsäuren und anderen Bestandteilen kann dem übrigen Organismus noch nützlich sein, indem sie den entstandenen Schaden durch Initiation und Beschleunigung der Hämostase in Grenzen hält. Dieser Idee folgend wurden daher für die Erstellung dieser Arbeit Lysate humaner und muriner Zellen auf deren prokoagulatorische Potenz im Sinne einer TF-Aktivierung untersucht. Der prokoagulatorisch wirksame Bestandteil des Lysates wurde dann mittels hemmender Antikörper identifiziert. Des Weiteren wurden defiziente Zellen mit Wildtypzellen oder Retransfektanten verglichen.

Da schon für PDI TF-aktivierende Eigenschaften gezeigt werden konnten (Reinhardt C et al. 2008; Manukyan D et al. 2008), rückten vor allem Proteine des ER ins Zentrum des Interesses. Dabei lag der Schwerpunkt auf den Mitgliedern des *Peptide-Loading Complex* (PLC), zu dessen Aufbau unter anderem PDI und das verwandte ERp57 gehört (Santos SG et al. 2007).

### **I.3 Der PLC**

#### Physiologie der Peptidbeladung im PLC und Antigenpräsentation:

Der PLC ist eine multimere Funktionseinheit im ER und erfüllt in dessen Lumen zwei wichtige physiologische Aufgaben. Einerseits erhöht er die Stabilität des noch nicht beladenen MHC Klasse I und vermittelt andererseits dessen Beladung mit Peptidfragmenten. Diese Peptidfragmente entstammen dem 26S-Proteasom, das mit seiner regulierenden Domäne ubiquitinylierte Strukturproteine, Transkriptionsfaktoren, sowie fehlgefaltete und pathogene Proteine in eukaryotischen Zellen erkennt und proteolysiert (Bedford L et al. 2010). Die entstandenen Peptidfragmente werden über den *Transporter associated with Antigen Processing* (TAP) in das ER-Lumen geschleust und von den ER-Aminopeptidasen 1 und 2 (ERAP1 und 2) auf die Länge von acht bis zehn Aminosäuren gekürzt. TAP assoziiert mit dem Chaperon Tapasin und bildet das Zentrum des PLC. Dieser TAP-Tapasin-Komplex rekrutiert die Lektine Calnexin (CNX) und dessen lösliches Analogon Calreticulin (CRT), sowie PDI und ERp57 als enzymatische Komponente, so dass die Bindetasche von MHC Klasse I erfolgreich mit den Antigen-Peptidfragmenten beladen werden kann (Abb. 3) (Røder G et al. 2008). Der beladene MHC Klasse I-Komplex dissoziiert vom PLC, verlässt das ER und wandert an die Zelloberfläche (Paulsson KM et al. 2004).



**Abbildung 3: Der PLC**

(Wearsch PA et al. 2008)

CNX und ERp57 wirken unterstützend auf die Bildung von Disulfidbrücken innerhalb des Histocompatibility Complex (HC), der sich anschließend mit  $\beta$ 2-Mikroglobulin (B2M) zu einem Heterodimer verbindet. Dieser wird bis zur Beladung mit den Peptidfragmenten durch Tapasin, ERp57 und CRT stabilisiert. Durch TAP1 und TAP 2 werden die vom Proteasom stammenden Peptidfragmente eingeschleust und von ERAAP/ERAP1 und ERAP2 bis zu der geeigneten Größe weiter prozessiert, um dann auf den leeren MHC Klasse I geladen zu werden (Wearsch PA et al. 2008).

Die einzelnen Komponenten des PLC, deren Untersuchung hinsichtlich der TF-Aktivierung Teil dieser Arbeit waren, werden im Folgenden näher charakterisiert.

#### MHC Klasse I und B2M:

Das MHC Klasse I besteht aus einer membrangebundenen schweren  $\alpha$ -Kette, einer löslichen Komponente in Form von B2M, und dem in der Bindetasche der schweren Kette befindlichen Peptidfragment. Die schwere Kette wird aus der  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-, und der  $\alpha$ 3-Untereinheit zusammengesetzt. Letztere vermittelt die Membranbindung, wohingegen sich die

Bindetasche für das Peptidfragment zwischen der  $\alpha 1$ - und der  $\alpha 2$ -Untereinheit befindet (Apostolopoulos V et al. 2008). Jedes dieser Peptidfragmente repräsentiert ein zytosolisches Protein dieser Zelle, so dass über MHC Klasse I das gesamte aktuelle Wirtsproteom zytotoxischen T-Zellen präsentiert wird. Zytotoxische  $CD8^+$  T-Zellen tasten die Peptide stetig ab und beantworten jede Abweichung in Form von viralen, fehlgefalteten oder Tumorproteinen mit der Zerstörung der Wirtszelle (Panter MS et al. 2012; Sijts EJ et al. 2011).

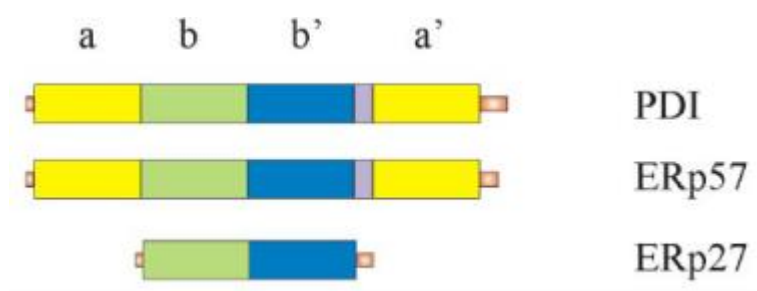
Das 99 Aminosäuren umfassende, nicht kovalent gebundene B2M besteht aus sieben antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, von denen die Faltblätter D und E die Bindung an die schwere  $\alpha$ -Kette von MHC Klasse I vermitteln. Außerdem nimmt es stabilisierende Funktionen innerhalb des PLC wahr. B2M spielt bei der Amyloidose (Eichner T et al. 2011) eine bedeutende Rolle und kann z.B. beim multiplen Myelom erhöht sein (Barlogie B et al. 1989).

#### PDI und ERp57:

Durch die Proteinausstattung des ER werden neu synthetisierte Proteine durch korrekte Faltung und posttranslationale Modifikationen in ihren Funktionszustand überführt. PDI und ERp57 haben Oxidase-, Reduktase- und Isomeraseaktivität, so dass sie Disulfidbrücken herstellen, spalten und modifizieren können. Der Aufbau von PDI und ERp57 ist mit den beiden katalytischen, jeweils ein CXXC-Motiv umfassenden Domänen a und a', sowie den dazwischenliegenden nicht-katalytischen Domänen b als Strukturelement und b', das peptidbindende Funktionen aufweist, ähnlich. Die c-Domäne am C-Terminus besteht bei PDI aus zahlreichen sauren Aminosäuren, bei ERp57 jedoch vermehrt aus basischen Aminosäuren (Ellgaard L et al. 2005).

ERp57 hat trotz dem PDI-ähnlichen Aufbau unterschiedliche physiologische Funktionen. Die b'-Domäne von ERp57 bindet beispielsweise die P-Domäne der Lektine CNX und CRT, wodurch es besonders für die Qualitätskontrolle von Glykoproteinen wichtig ist (Hatahet F et al. 2009). Außerdem kann ERp57 kovalent an Tapasin gebunden sein (s. u.) und kann das 27.7 kDa Protein ERp27 über einen ähnlichen Mechanismus wie CRT binden (Alanen HI et al. 2006).

Die Abb. 4 zeigt den strukturellen segmentalen Aufbau von drei Mitgliedern der PDI-Familie, PDI, ERp57 und ERp27.



**Abbildung 4: PDI-Familienmitglieder PDI, ERp57 und ERp27**

PDI und sein strukturähnlichstes Analogon ERp57 sind jeweils mit den katalytischen Domänen a und a' sowie mit den Strukturdomänen b und b' ausgestattet. ERp27 besitzt nur die beiden Strukturdomänen (Alanen HI et al. 2006).

#### CNX und CRT:

Das 90 kDa schwere CNX ist ein Typ I Transmembranprotein des ER, das einen zytoplasmatischen C-Terminus und einen luminalen N-Terminus besitzt. Das strukturanaloge 60 kDa schwere CRT ist als lösliches Protein im ER-Lumen lokalisiert (Williams DB 2006). Neu synthetisierte Proteine werden bei der Einschleusung in das ER mit einem Glykan aus drei Glukose-, neun Mannose- und zwei N-acetyl-Glukosaminmolekülen ausgestattet (Hebert DN et al. 2007), welches ein spezifisches Bindemotiv für CNX und CRT darstellt. Beide Chaperone können auch mit Polypeptidmustern nicht-glykosylierter Proteine interagieren (Ihara Y et al. 1999). CNX und CRT bestehen aus einer globulären Lektindomäne und einer ausladenden, prolinreichen P- oder Armdomäne, die ERp57 an ihrer Spitze bindet. Zusammen mit anderen Chaperonen bilden CNX, CRT und ERp57 den Calnexinzyklus, der die Faltung und Qualitätskontrolle für N-glykosylierte Proteine übernimmt (Kozlov G et al. 2010). Dabei verhindern sie die Aggregation der neuen Proteine und ermöglichen so die ungestörte Arbeit der beteiligten Enzyme wie der Oxidoreduktase ERp57. Diese stabilisierende Funktion wird von einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion der Lektindomäne ermöglicht (Pocanschi CL et al. 2011), wohingegen die ERp57-Bindung durch die Anwesenheit von  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen unterstützt wird (Leach MR et al. 2002).

### Tapasin:

Tapasin ist ein 428 Aminosäuren umfassendes Transmembranprotein des ER, das zur Ig-Superfamilie gehört (Ortmann B et al. 1997). Als zentrales Chaperon des PLC vermittelt es die Verbindung zwischen TAP und dem noch leeren MHC Klasse I, weswegen es auch TAP-bindendes Protein (TAPBP) genannt wird. Dabei stabilisiert es MHC Klasse I und hält es bis zur Beladung mit dem Peptidfragment über sein doppeltes Lysinmotiv KKKAE am zytoplasmatischen C-Terminus im ER fest (Li S et al. 1997). Außerdem entsteht aus Cys<sup>95</sup> von Tapasin und Cys<sup>57</sup> von ERp57 ein über eine Disulfidbrücke gebundenes Heterodimer. Auf diese Weise werden eine Oxidoreduktase und indirekt Lektine mit dem PLC assoziiert (Raghavan M et al. 2008; Panter MS et al. 2012). Eine Disulfidbrücke zwischen Tapasin und PDI, das der Struktur von ERp57 am ähnlichsten ist, wurde nicht beobachtet (Dong G et al. 2009). Eine fehlerhafte oder fehlende Expression von Tapasin führt zu einer herabgesetzten Präsentation von MHC Klasse I an der Zelloberfläche (Garbi N et al. 2000).

## **I.4 Ziel der Forschungsarbeit**

TF stellt einen zentralen prokoagulatorischen Kofaktor und inflammatorischen Mediator dar. Seine zentrale Stellung in physiologischen und pathologischen Prozessen führte zu der Hypothese, dass TF selbst einem Kontroll- und Aktivierungsmechanismus unterworfen sein muss, der unmittelbar nach einer traumatischen Gewebsverletzung initiiert wird.

Daher bestand das Ziel dieser Arbeit darin, die Beteiligung von Proteinen des endoplasmatischen Retikulums, insbesondere des PLC, bei der posttranslationalen Aktivierung von TF zu analysieren und damit frühe Initiatoren und neue Aktivatoren des extrinsischen Gerinnungsweges zu charakterisieren. Außerdem wurde auch der Einfluss von Temperatur und pH-Wert untersucht.

Folgende Fragen wurden vor Durchführung der Experimente formuliert:

1. Führt eine Zelllyse zur Aktivierung von TF?
2. Tragen die PDI-Analoga ERp57 und ERp27 zur TF-Aktivierung bei?
3. Welche Bedeutung haben Proteine des PLC bei der TF-Aktivierung?
4. Welche Rolle spielen Temperatur und pH-Wert bei der TF-Aktivierung?

## II Material und Methoden

### II.1 Material

#### II.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
ELISA-Reader MR7000	Dynatech Laboratories (Alexandria, USA)
Lichtmikroskop Axiovert100	Zeiss (Jena, D)
Mini-MACS-Trennsäulen	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
pH-Glaselektrode	Hanna Instruments (Kehl a. Rhein, D)
pH-Meter	Hanna Instruments (Kehl a. Rhein, D)
Photometer	Spectra Rainbow TECAN (Crailsheim, D)
Schüttler Typ KS 250 basic	IKA-Labortechnik (Staufen, D)
Spritzenfilter 0.2µm	Roth (Karlsruhe, D)
Ultraschallgerät Branson Sonifier Cell Disrupter B-15	Heinemann (Schwäbisch Gmünd, D)
Vortex Genie-2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Zellkulturbank	Heraeus, LaminAir, HLB 2472 (Hanau, D)
Zentrifugen: Rotina 35R/Universal 32, Mikro 22R	Hettich (Tuttlingen, D)

#### II.1.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Falcon-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Becton Dickinson (Heidelberg, D)

Mikrotiterplatten 6, 12, 96 Vertiefungen	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Parafilm	American Can Company (Greenwich, USA)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim, D)
Pipettenspitzen D10, D200, D1000	Gilson (Limburg-Offheim, D)
Stripetten 5 ml, 10 ml	Corning (Lowell, USA)
Vakuumfiltrationsaufsätze 2,0 µm, 500 ml	Hartenstein Laborbedarf GmbH (Würzburg, D)
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup> , gerader Hals	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup> , gerader Hals	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Zellkulturflaschen 175 cm <sup>2</sup> , gerader Hals	Becton Dickinson (Heidelberg, D)

### II.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Substrate

Chemikalien, Reagenzien und Substrate	Hersteller
BC von Willebrand-Reagenz	Dade Behring (Marburg, D)
Blutserum, Kaninchen	Rockland (Gilbertsville, USA)
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, D)
Geneticin (G-418)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Innovin®	Dade Behring (Marburg, D)
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen (Karlsruhe, D)
LPS (Lipopolysaccharid)	Sigma (Deisenhofen, D)
Penicillin/Streptomycin	PAA-Laboratories (Pasching, A)
Privigen®	CSL Behring GmbH (Hattersheim am Main, D)

Protein Assay Reagent A	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
Protein Assay Reagent B	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)
RecombiPlasTin	Instrumentation Laboratory (Lexington, USA)
S2222™	Haemochrom Diagnostica GmbH (Essen, D)
Salzsäure 37%	Roth (Karlsruhe, D)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Trypsin EDTA	PAA-Laboratories (Pasching, A)

#### II.1.4 Puffer und Lösungen

Alle Chemikalien zur Herstellung der Puffer wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D), Roth (Karlsruhe, D) und Merck (Darmstadt, D) bezogen und sind nicht gesondert aufgeführt.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung/Hersteller
Antikörperpuffer	5 mM EDTA; 0,5% BSA; in PBS; pH 7,4
Monozytenwaschpuffer	1 mM EDTA; 0,15% BSA; in PBS; pH 7,4
PBS	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Gelatine 2%	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Resuspensionspuffer	138 mM NaCl; 12 mM NaHCO <sub>3</sub> ; 5 mM D-Glucose; 5 mM Hepes; 2,7 mM KCl; 1 mM MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O; 0,4 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O; in aqua bidest; pH 7,35
TRIS-Puffer	100 mM NaCl; 10 mM TRIS; in aqua bidest; pH 7,4



### II.1.5 Antikörper und Proteine

Antikörper und Proteine	Hersteller/Bezugsquelle	Zielantigen
Calreticulin	Biomol (Hamburg, D)	
ERp27, ERp27 Domäne 1, ERp27 (Cys:Ala)	Prof. Lloyd Ruddock (Oulu, FIN)	
Faktor X	Calbiochem/Merck (Darmstadt, D)	
Kaninchen anti-Calnexin (SPA-860)	Biomol (Hamburg, D)	C-Terminus Calnexin
Kaninchen anti-Calnexin (SPA-865)	Biomol (Hamburg, D)	N-Terminus Calnexin
Kaninchen anti-ERp57	Abcam (Cambridge, UK)	ERp57
Kaninchen Isotypkontrolle IgG	Zymed® Laboratories (San Francisco, USA)	
B2M	AbD Serotec (Oxford, UK)	
Maus anti-B2M IgG2a	Acris (Herford, D)	β2-Mikroglobulin
Maus anti-B2M IgG2b	Acris (Herford, D)	β2-Mikroglobulin
Maus anti-Calreticulin IgG1	BD Biosciences Europe (Erembodegem, BE)	Calreticulin
Maus anti-MHC Klasse I B9.12.1	Dr. François Lemonnier (Paris, F)	MHC Klasse I
Maus anti-MHC Klasse I W6/32 IgG2a	Dr. med. G. Moldenhauer (Heidelberg, D)	MHC Klasse I

Maus anti-PDI IgG2a	Affinity BioReagents (Golden, USA)	PDI
Maus anti-TF VIC7, Maus anti-TF VIC12	Dr. Sybille Albrecht (Dresden, D)	Humaner TF
Maus Isotypkontrolle IgG1	Invitrogen (Karlsruhe, D)	
Maus Isotypkontrolle IgG2a	Invitrogen (Karlsruhe, D)	
Maus Isotypkontrolle IgG2b	Acris (Herford, D)	
NovoSeven®	Novo Nordisk Pharma GmbH (Mainz, D)	
PDI	Labor Prof. Engelmann	
sTF214, sTF218	Labor Prof. Engelmann	

### II.1.6 Zellkulturmedien

Zellkulturmedium	Hersteller
D-MEM 1,0 g/L Glucose	Invitrogen (Karlsruhe, D)
D-MEM 4,5 g/L Glucose	Invitrogen (Karlsruhe, D)
ECGM	PromoCell (Heidelberg, D)
FBS	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Freezing Medium	ibidi (Martinsried, D)
MEM- $\alpha$	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Opti®MEM	Invitrogen (Karlsruhe, D)
RPMI 1640	Invitrogen (Karlsruhe, D)

Wasser für Zellkultur	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
-----------------------	--------------------------------

### II.1.7 Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle
CHO	CCL-61, American Type Culture Collection
Daudi	Peter Cresswell, Ph.D. (New Haven, USA)
Daudi + B2M	Peter Cresswell, Ph.D. (New Haven, USA)
HEK-293	Prof. Dr. Marius Ueffing (München, D)
HUVEC	PD Dr. Stefan Linder (München, D)
LCL.220B*4402	Peter Cresswell, Ph.D. (New Haven, USA)
LCL.220B*4402 + TPN	Peter Cresswell, Ph.D. (New Haven, USA)
K562	PD Dr. Frank Momburg (Heidelberg, D)
K562.A2	PD Dr. Frank Momburg (Heidelberg, D)
MEF K41	Dr. Maurizio Molinari (Bellinzona, CH)
MEF K42 (CRT <sup>-/-</sup> )	Dr. Maurizio Molinari (Bellinzona, CH)
MEF 22175tag	Dr. Maurizio Molinari (Bellinzona, CH)
MEF 2175.C10 57 <sup>-/-</sup>	Dr. Maurizio Molinari (Bellinzona, CH)
MEF WTM1C (sCNX)	Dr. Maurizio Molinari (Bellinzona, CH)
MEF KO mix	Dr. Maurizio Molinari (Bellinzona, CH)
THP-1	DSMZ ACC 16, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, D)

## II.2 Methoden

### II.2.1 Grundsätzlicher Versuchsaufbau

Die komplexen Abläufe der Hämostase wurden größtenteils in einem vereinfachten Wundmodell simuliert. So wurden die durch eine Verletzung zerstörten Zellen durch unterschiedliche Zelllysate repräsentiert. Die unmittelbar nach der Verletzung eintretende Hämostase wurde auf verschiedene Tissue Factor-Proteine (siehe unten) und die isolierten Gerinnungsfaktoren FVIIa und FX reduziert. Wie schon erwähnt bildet TF mit diesen beiden Faktoren die Achse der extrinsischen Hämostase.

### II.2.2 TF

Als TF-Spezies wurden folgende Proteine, Reagenzien und lebende Zellen herangezogen:

- Löslicher TF mit 214 und 218 Aminosäuren ohne Transmembrandomäne (soluble TF; sTF214 und sTF218) in einer Konzentration von 20 ng/ml bzw. 40 ng/ml.
- Innovin®, ein TF-haltiges Reagenz, das zur Bestimmung der Prothrombinzeit diagnostische Relevanz hat. Dabei ist TF in Lipidvesikeln rekonstituiert. Es repräsentiert *full length* TF (flTF).
- THP-1, eine monozytäre Leukämiezelllinie
- Humane Monozyten, die nach der Isolation aus Vollblut mit LPS zur verstärkten Expression von inaktivem TF angeregt wurden.

### II.2.3 Zellkultur

#### II.2.3.1 Durchführung der Zellkultur

Der folgende Ablauf gilt für alle verwendeten Zelllinien. Besonderheiten in der Kultur einzelner Zelllinien werden weiter unten erläutert. Alle Verbrauchsgegenstände, Chemikalien und Medien für die Zellkultur waren steril. Die Arbeitsschritte fanden unter einer Zellkulturbank mit laminarem Luftzug statt. Nach dem Auftauen und Zentrifugieren des Einfriermediums wurden die Zellen im jeweiligen Medium resuspendiert und in die Zellkulturflaschen gegeben. Im Brutschrank wurden sie bei 37°C, 5%CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert, bis die Konfluenz bei adhärenenten, beziehungsweise bis ein Anstieg der Zellpopulation bei nicht-adhärenenten Zellen, erreicht war. Kontrollinspektionen auf Wachstum und etwaige Kontamination erfolgten täglich. Der erste Mediumwechsel erfolgte am nächsten Tag, danach alle zwei Tage. Adhärenente Zellen wurden geerntet, indem zunächst das Medium entfernt und der Zellrasen mit PBS gespült wurde. Nachdem die Zellen durch

Zugabe von Trypsin-EDTA von dem Flaschenboden gelöst waren, wurde die Trypsinaktivität durch Zugabe von FBS gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einer Stripette in ein Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert. Nach dem Abgießen des Überstandes wurden die Zellen gewaschen, indem das zentrifugierte Zellpellet zweimal mit Puffern oder Medium resuspendiert wurde. Danach waren die Zellen bereit für die Versuche oder wurden gesplittet bzw. für spätere Zwecke mit Einfriermedium eingefroren. Dazu wurde das jeweilige Zellpellet in Einfriermedium aufgenommen und zunächst bei - 80° C eingefroren, bis es nach ein paar Tagen in den Stickstofftank überführt wurde.

#### II.2.3.2 Spezielle Zellkulturbedingungen der verschiedenen Zelllinien

CHO: CHO-Zellen wurden in 90% MEM- $\alpha$ , 9% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin inkubiert. Das Ablösen des Zellrasens nach Konfluenz erfolgte mit PBS/EDTA.

THP-1 und HEK-293: Diese Zelllinien wurden in 90% RPMI 1640, 9% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin inkubiert.

HUVEC: HUVEC wurden in 50% Promocell ECGM, 40% D-MEM (1g/L Glucose), 9% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin inkubiert. Die leeren Kulturflaschen erhielten zunächst einen Boden aus 0,2% Gelatine. Nach halbstündiger Inkubation bei 37°C wurde die übrige Gelatinelösung abgenommen und PBS zur Spülung der Flasche eingebracht. Nach dem Waschen konnten die Zellen ausgesät werden.

MEF: Insgesamt lagen sechs verschiedene MEF-Zelllinien vor; eine ERp57 defiziente Mutante, eine CRT defiziente Mutante, eine Mutante, die sCNX ausbildet, und drei korrespondierende Wildtyplinien.

Für die Untersuchung von ERp57 wurden verwendet:

- Mutante MEF 2175.C10 57<sup>-/-</sup>
- Wildtyp MEF 22175tag

Diese Zellen benötigten 90% D-MEM, 9% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin.

Für die Untersuchung von CRT wurden verwendet:

- Mutante MEF K42
- Wildtyp MEF K41

Diese Zellen benötigten 91% MEM $\alpha$ , 8% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin.

Für die Untersuchung von sCNX wurden verwendet:

- Mutante KO MEF mix
- Wildtyp MEF WTM1C

Diese Zellen benötigten 90% D-MEM, 9% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin.

Die Zellen wurden bereits bei einer Konfluenz von maximal 50% geerntet, da sie sich sonst rasch vom Flaschenboden lösen und nekrotisch werden. Außerdem bildeten die Zellen bei einem höheren Konfluenzgrad starke Zell-Zell-Adhäsionen aus, die sich schlecht lösen ließen und das Zählen einzelner Zellen im Mikroskop erschwerten. Die Ablösung erfolgte mit PBS/EDTA.

K562: Die K562-Zellen wurden in 90% RPMI 1640, 9% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin inkubiert. Das Medium für die retransfizierten K562.A2 enthielt zusätzlich 0,5 mg/ml Geneticin (G-418).

LCL.220B und Daudi: Diese Zelllinien und ihre Retransfektanten wurden in 90% RPMI 1640, 9% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin inkubiert.

#### II.2.3.3 Zählen der Zellen

Aus der Suspension geernteter Zellen wurde eine Verdünnung im Verhältnis 1:10 verwendet. Anschließend wurde das gleiche Volumen einer 0,05%igen Trypanblau-Lösung hinzupipettiert. 2  $\mu$ l der Mischung wurden in die Neubauer-Zählkammer eingebracht, in der die Zellen in vier Quadranten ausgezählt wurden. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors konnte – neben der mikroskopischen Beurteilung der Zellvitalität - so die Zellkonzentration in der Ausgangssuspension berechnet werden.

#### II.2.4 Lysatherstellung

Die Zelllyse erfolgte rein physikalisch ohne den Zusatz von Tensiden wie Triton<sup>®</sup> X-100 oder SDS. Nach allen Lyseverfahren wurde das Ergebnis mikroskopisch kontrolliert, indem eine Lysatprobe mit Trypanblau gefärbt wurde. Die zerstörten Zellen nahmen den Farbstoff auf oder es konnten unter dem Mikroskop die Zellfragmente identifiziert werden.

Zur Zelllyse wurden drei Verfahren durchgeführt:

1. Lysieren durch Pipettenstöße: Dabei wurden nach der Zentrifugation 40 Stöße auf das Zellpellet mittels Pipette und 200 µl Pipettenspitze ausgeführt. Dabei konnten mikroskopisch nur wenige beschädigte Zellen identifiziert werden.

2. Lysieren durch Ultraschall: In einem Gesamtvolumen von 200 µl wurden die Zellen mittels Ultraschallsonde für 10 bis 50 Sekunden bei 150 Watt lysiert. Mikroskopisch zeigte sich eine komplette Zerstörung der Zellen. Gegen die Überhitzung wurde die Prozedur im Kühlraum bei 4°C auf Eis durchgeführt.

3. Lysieren durch Stickstoff: Die resuspendierten Zellen wurden dreimal für jeweils eine Minute in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend im Wasserbad bei 20°C wieder aufgetaut. Wurde das Zelllysate nicht sofort für Versuche verwendet, so wurde es unmittelbar nach der dritten Stickstoffbehandlung bei - 80°C konserviert.

## **II.2.5 Monozytenisolation und Monozytenstimulation**

Zur Isolation von Monozyten wurden 50 ml Vollblut aus der V. mediana cubiti von gesunden Spendern im Alter von 19 bis 40 Jahren nach ausreichender Hautdesinfektion entnommen. Vor der Blutentnahme erfolgte eine Anamnese. Spender, die regelmäßig oder bei Bedarf Medikamente einnahmen oder an einer Störung der Blutgerinnung litten, wurden nicht als Spender herangezogen. Die Geschlechterverteilung war zufällig. Das Blut wurde nach der Abnahme sofort mit einer 12,5 mM Trisnatriumcitratlösung antikoaguliert. Die Leukozytenmanschette, die sich nach der Zentrifugation (15 Minuten, 1300 rpm) zwischen der Erythrozyten- und der Plasmaphase gebildet hatte, wurde mit PBS im Verhältnis 1:4 verdünnt. Die verdünnten Leukozyten wurden auf Ficoll-Paque übertragen und einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Die so aufgereinigte Leukozytenphase wurde mit Monozytenwaschpuffer resuspendiert und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 400 µl Antikörperpuffer aufgenommen und mit 50 µl CD14-Microbeads gemischt. Diese magnetischen Antikörper binden das Monozyten-spezifische CD14. Nach 15-minütiger Inkubation bei 4°C wurde die Zellsuspension in eine mini-MACS-Säule gefüllt und dreimal mit Antikörperpuffer gespült, während die mit den Microbeads gebundenen Monozyten im Magnetfeld haften blieben. Im Anschluss daran wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen und die Monozyten ausgespült.

Zur Stimulation wurden isolierte Monozyten in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^6$  Zellen/ml in RPMI-1640 Zellkulturmedium für 4 Stunden bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> mit Lipopolysaccharid (LPS) 10 ng/ml inkubiert. Monozytäres CD14 bindet LPS, wodurch über den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) und das akzessorische Protein MD-2 MAPK-Signalwege und der MyD88-abhängige IκB-NFκB-Signalweg aktiviert werden. So werden Transkriptionsfaktoren phosphoryliert, was schließlich zu einer Induktion der TF-Synthese der Monozyten führt (Guha M and Mackman N 2001).

## **II.2.6 Faktor Xa-Bildung im Two-Stage-Assay**

In die Vertiefungen einer 96-Mikrotiterplatte wurden 20 µl einer 20 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung vorgelegt, in die die vorbereiteten Proben pipettiert wurden. Zu den Reaktionsansätzen wurde zuerst 1 µM FVIIa und nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten 5 µM FX hinzugefügt. Komplettiert wurde der Reaktionsansatz durch 10 µl S2222. Die Serinproteaseaktivität des durch die zu erwartenden Reaktionen gebildeten FXa spaltet vom farblosen chromogenen Substrat S2222 den gelben Farbstoff p-Nitroanilin ab, mit dem photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm (Referenzfilter 550 nm) die Aktivität des umgesetzten FXa bestimmt wurde. Diese ist proportional zu der Menge an funktionellem TF in den Proben, ohne die die Aktivierung des FX nicht erfolgt wäre. Eine Hemmung mit anti-TF-Antikörper erfolgte zum Nachweis eines direkt TF-abhängigen Prozesses. Parallel hierzu wurde aus rekombinantem TF (HemosIL™ RecombiPlasTin) eine Standardkurve aus sechs unterschiedlichen Konzentrationen ermittelt.

### **II.2.6.1 Antikörperhemmversuche**

Zur Detektion prokoagulatorisch wirksamer Proteine wurden neutralisierende Antikörper verwendet. Diese hemmten die Funktion und resultierten in einer verminderten FXa-Bildung. Die TF-Quelle und der Antikörper wurden vor der Zugabe des Lysates im Reaktionsgefäß vorgelegt. Nach der Zugabe inkubierte der Reaktionsansatz 5 Minuten, ehe er in die Mikrotiterplatte pipettiert wurde.

### **II.2.6.2 Versuche mit defizienten Zellen**

Nach dem Ernten der defizienten und der korrespondierenden Wildtypzellen wurden diese gezählt und auf die zu verwendende Konzentration gebracht. Danach wurden sie lysiert oder als intakte Zellen der Xa-Bildung zugeführt und vergleichend deren Aktivität im Photometer gemessen.



### II.2.6.3 pH-Versuche

Die prokoagulatorische Aktivität von sTF214, sTF218 und THP-1-Zellen wurde bei pH 6,4 im Vergleich zum physiologischen pH 7,4 getestet. Dazu wurden die zu untersuchenden Proteine und Zellen in einem Volumen von 20 µl bei pH 7,4 vorgelegt. Anschließend wurden 50 µl Puffer in vorher eingestellten pH-Werten hinzugefügt, so dass sich nach dem Mischen die zu untersuchenden pH-Werte einstellten. Um beispielsweise im Endvolumen von 70 µl den pH auf 6,8 einzustellen, wurden 50 µl eines TRIS-Puffers mit pH 6,69 pipettiert. Dieser pH-Wert (P) wurde berechnet, indem die bekannte Protonenkonzentration für die Verdünnung der TF-Quelle (T) von der bekannten Protonenkonzentration des Gesamtendvolumens (G) mit dem Ziel-pH subtrahiert wurde. Beispiel für pH 6,8 im Gesamtendvolumen:

pH 6,8 entspricht einer Protonenkonzentration von  $10^{-6,8}$  M

$$G = \frac{10^{-6,8}}{70 \cdot 10^6} \quad T = \frac{10^{-7,4}}{20 \cdot 10^6} \quad G - T = P$$

Der einzustellende pH-Wert für den zugefügten Puffer berechnet sich folgendermaßen:

$$-\log\left(\frac{P}{50} \cdot 10^6\right)$$

Analog wurden TRIS-Puffer mit pH 7,14 (für Ziel-pH 7,4) und pH 6,23 (für Ziel-pH 6,4) vorbereitet.

Nach Zugabe des pH-Puffers inkubierten die Proben für 5 Minuten, um danach der FXa-Bildung zugeführt zu werden.

### II.2.6.4 Temperaturversuche

Die Temperaturversuche wurden mit PBS durchgeführt. THP-1-Zellen und sTF wurden jeweils für 10 Minuten im Wasserbad bei 42° C inkubiert. Anschließend wurden die Proben im Eiswasserbad 5 Minuten abgekühlt. Auch die zuvor nicht erhitzten Vergleichsproben wurden im Eiswasser abgekühlt, um die Abkühlung als Diskriminante auszuschließen. Danach wurden die Proben der FXa-Bildung zugeführt.

## II.2.7 Proteinmessung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration verschiedener Proben wurde ein Protein Assay Kit der Firma Bio-Rad mit der kupferionenhaltigen Lösung A und dem Folin-Phenol-haltigen

Reagenz Lösung B verwendet. Lösung B reduziert den Kupferkomplex aus dem Probenprotein und Lösung A, so dass die entstandene Farbveränderung photometrisch bei 700 nm analysiert werden kann. Anschließend kann die Proteinkonzentration unter Bezug auf eine BSA-Standardkurve bestimmt werden (modifiziert nach Lowry OH et al. 1951).

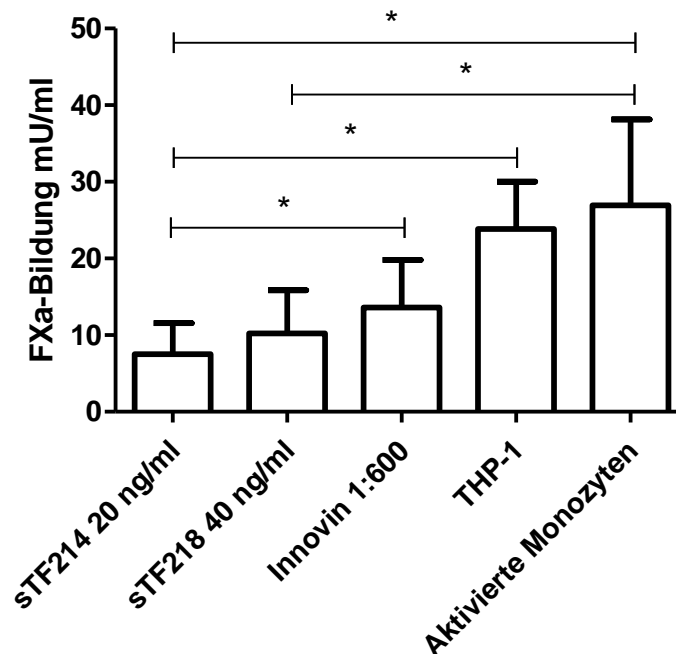
#### **II.2.8 Auswertung und Statistik**

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Software GraphPadPrism 5. Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (S.D.) oder  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) dargestellt. Alle Datensätze wurden mittels Kolmogorow-Smirnow-Test auf Normalverteilung geprüft. Die Analyse erfolgte bei Normalverteilung bei zwei Gruppen mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test und bei mehr als zwei Gruppen mittels one way ANOVA-Test. Lag keine Normalverteilung vor, so kam der zweiseitige Wilcoxon-Mann-Whitney-Test bei zwei Gruppen und der Kruskal-Wallis-Test bei mehr als zwei Gruppen zur Anwendung.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant bezeichnet.

## III Ergebnisse

### III.1 Aktivitätszunahme von TF durch Zelllysatzstimulation

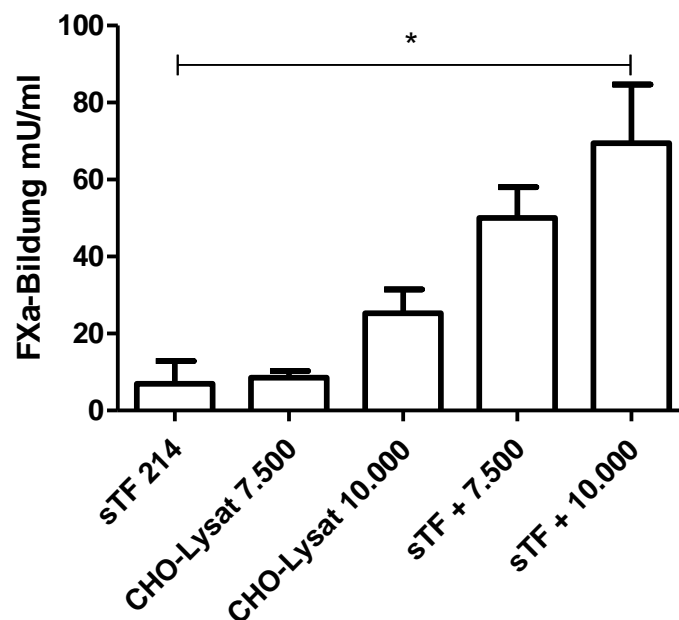
Die isolierten, extrazellulären Domänen von TF (sTF214 und sTF218), in Lipidvesikeln rekonstituierter TF (fITF (Innovin®)), und TF-exprimierende Zellen (aktivierte Monozyten und THP-1-Zellen) zeigten auch ohne vorherige Behandlung Eigenaktivität in der FXa-Bildung (Abbildung 5), die den Anteil des schon aktivierten TF vor der Stimulation darstellt. Diese TF-Spezies wurden in der vorliegenden Pilotstudie mit Zelllysaten und Proteinen zur Identifikation von TF-Aktivatoren, die den Anteil an *encrypted* TF in den prokoagulatorisch wirksamen Zustand versetzen können, stimuliert.



**Abbildung 5: Prokoagulatorische Aktivitäten von TF-Proteinen bzw. TF-exprimierenden Zellen in der FXa-Bildung**

Löslicher TF mit 214 und 218 Aminosäuren (sTF214 und sTF218) wurde in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Innovin® (fITF) wurde vor den Versuchen im Verhältnis 1:600 verdünnt. Bei den lebenden Zellen (THP-1 und aktivierte Monozyten) wurden jeweils 10.000 Zellen eingesetzt. Monozyten wurden vor den Versuchen für 4 Stunden mit LPS 10 ng/ml stimuliert. n (sTF214) = 51; n (sTF218) = 23; n (Innovin) = 20; n (THP-1) = 3; n (Aktivierte Monozyten) = 8. Mittelwerte  $\pm$  S.D. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle (sTF214).

Wurde sTF mit TF-freiem CHO-Zelllysats inkubiert, so kam es zu einer verstärkten Bildung von FXa. In der Tat zeigte sich, dass die Zugabe von 20 ng/ml sTF214 zu durch Ultraschallbehandlung oder durch Einfrieren und Auftauen gewonnenem CHO-Zelllysats, das nach Einfrieren und Auftauen, nicht aber nach der Ultraschallbehandlung die FXa-Bildung zu einem geringen Teil selbst förderte, eine deutliche Steigerung der TF-Aktivität gegenüber sTF alleine induzierte (Abb. 6). Nur nach Zugabe des durch Einfrieren und Auftauen gewonnenen Lysates zeigte sich der Effekt statistisch signifikant.



**Abbildung 6: Stimulierung der FXa-Bildung durch sTF214 in Gegenwart von CHO-Zelllysats**

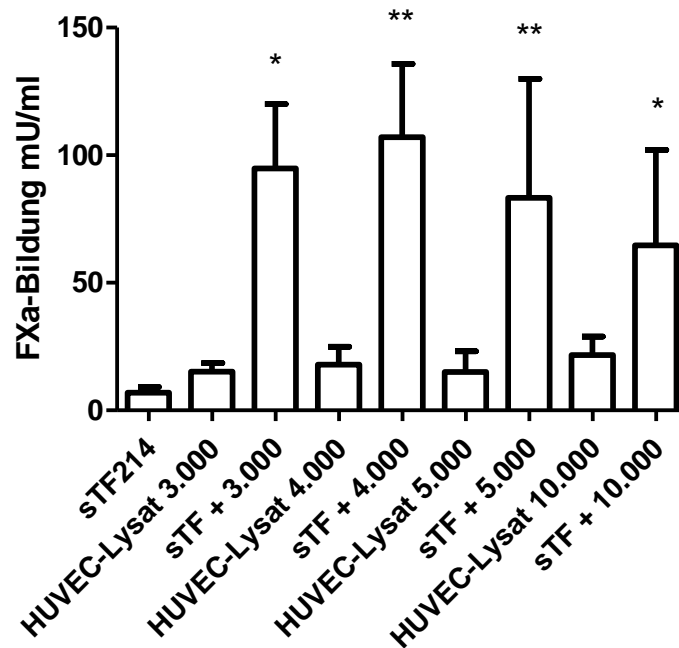
sTF214 wurde in einer Konzentration von 20 ng/ml eingesetzt.

CHO-Zellen (7.500) wurden durch Ultraschallbehandlung (10 s, 150 W) lysiert. n = 3. Mittelwerte  $\pm$  S.D.

CHO –Zellen (10.000) wurden durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen lysiert. n = 6.

Mittelwerte  $\pm$  S.D. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle (sTF214).

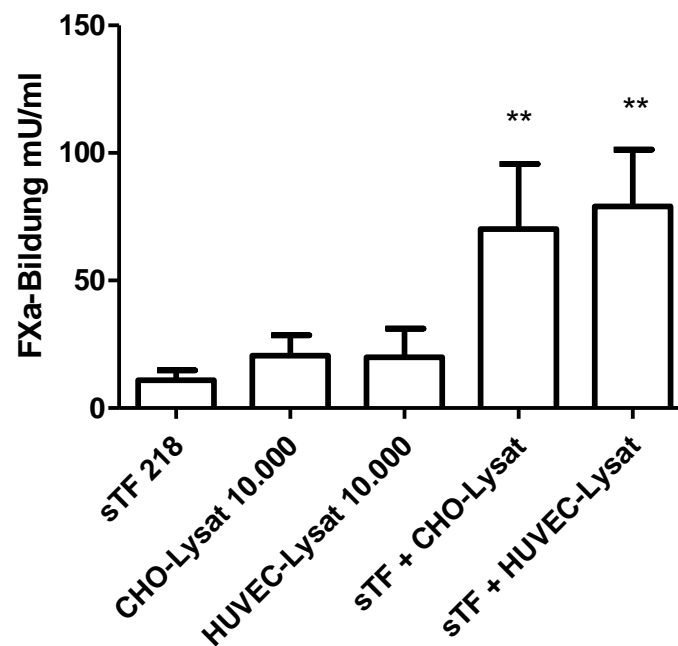
In Gegenwart von HUVEC-Zelllysate, das die FXa-Bildung partiell selbst steigerte, kam es zu einer synergistischen Steigerung der prokoagulatorischen Aktivität von sTF214 (20 ng/ml). Dabei war auffällig, dass bei einer niedrigeren Zellzahl im Lysat eine stärkere Stimulation stattfand (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Stimulierung der FXa-Bildung durch sTF214 in Gegenwart von HUVEC-Zelllysate**

sTF214 (20 ng/ml) wurde mit HUVEC-Zelllysaten inkubiert. Die HUVEC-Zelllysate wurden durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen hergestellt. Die in Klammern angegebenen Zahlen beziehen sich auf die verwendete Zellzahl. sTF214 und HUVEC (3.000) n = 3; sTF214 und HUVEC (4.000) n = 10; sTF214 und HUVEC (5.000) n = 18; sTF214 und HUVEC (10.000) n = 3. Mittelwerte  $\pm$  S.D. \* p<0,05 vs. Kontrolle (sTF214). \*\* p<0,0001 vs. Kontrolle (sTF214).

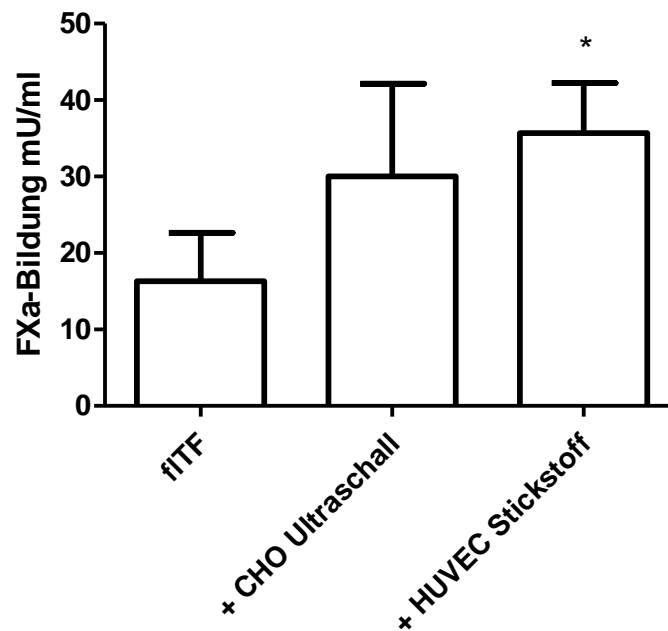
Ebenso wurde die prokoagulatorische Aktivität von sTF218 (40 ng/ml) in Gegenwart von CHO- und HUVEC-Zelllysaten deutlich gesteigert (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Stimulierung der FXa-Bildung durch sTF218 in Gegenwart von CHO- und HUVEC-Lysaten**

sTF218 (40 ng/ml) wurde mit durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff hergestelltem CHO-Zelllysaten (10.000 Zellen) bzw. HUVEC-Zelllysaten (10.000 Zellen) inkubiert. n = 5 (CHO); n = 8 (HUVEC). Mittelwerte  $\pm$  S.D. \*\*  $p < 0,0001$  vs. Kontrolle (sTF218).

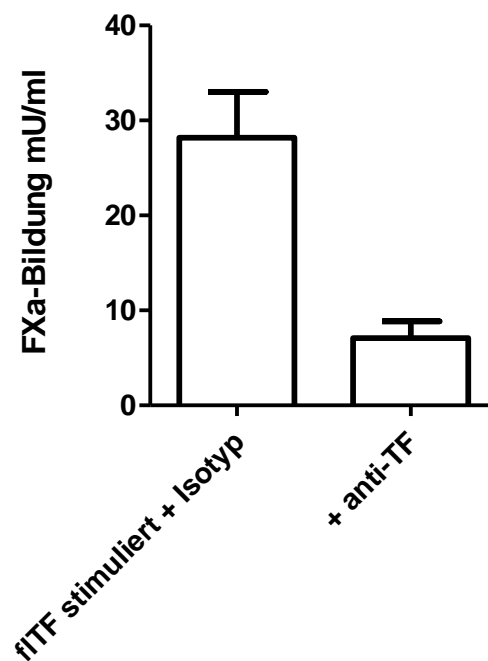
Die prokoagulatorische Aktivität des in Lipidvesikeln rekonstituierten TF – *full length* TF (Innovin®, fITF) - wurde ebenfalls durch CHO- und HUVEC-Zelllysate gesteigert (Abbildung 9). Dabei zeigte sich im Falle der durch Ultraschallbehandlung lysierten CHO-Zellen eine Tendenz zur Zunahme der zum gebildeten FXa proportionalen TF-Aktivität, wohingegen diese im Falle der durch Stickstoff eingefrorenen und wieder aufgetauten HUVEC-Zellen statistisch signifikant gesteigert ist.



**Abbildung 9: Stimulierung von fITF in Gegenwart von CHO- und HUVEC-Lysat in der FXa-Bildung**

fITF wurde in allen Versuchen vor der Zugabe zum Assay im Verhältnis 1:600 verdünnt. Das Lysat aus CHO-Zellen (5.000 Zellen) wurde durch Ultraschallbehandlung (50 s, 150 W) hergestellt. Das HUVEC-Zelllysate (10.000 Zellen) wurde durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen gewonnen. n = 3-6. Mittelwerte  $\pm$  S.D. \* p<0,05 vs. Kontrolle (fITF).

Nach Zugabe des neutralisierenden anti-TF-Antikörpers VIC7 war die prokoagulatorische Aktivität des durch CHO-Zelllysate stimulierten fTF zu etwa 80% gehemmt. Dies zeigte, dass das CHO-Zelllysate TF direkt aktivierte (Abbildung 10), wobei der Effekt nicht statistisch signifikant war.

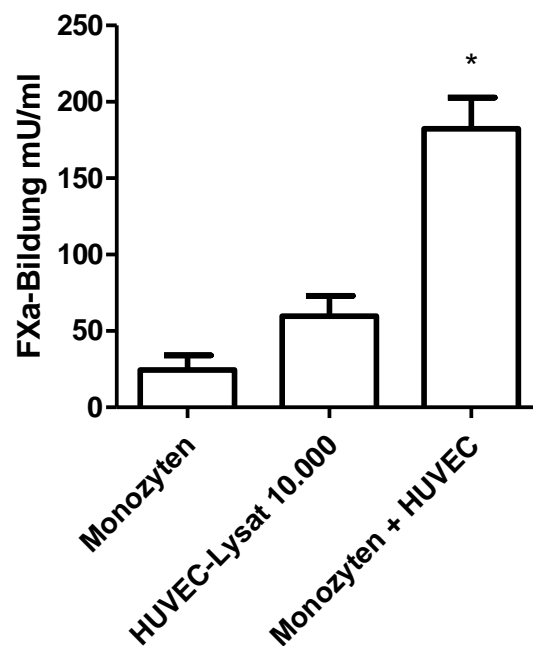


**Abbildung 10 Hemmung der FXa-Bildung durch anti-TF-Antikörper**

fTF in einer Verdünnung von 1:600 wurde mittels CHO-Lysat (5.000 Zellen mittels Ultraschallbehandlung (10 s, 150 W) lysiert) stimuliert. Den Ansätzen wurde ein Isotyp-Kontrollantikörper bzw. ein neutralisierender anti-TF-Antikörper (VIC7) in einer Konzentration von je 10 µg/ml zugegeben. n = 3. Mittelwerte ± S.D. p = 0,1 vs. Kontrolle (fTF stimuliert + Isotyp).



Ruhende inaktive Monozyten exprimieren nur eine geringe Menge an TF auf ihrer Zelloberfläche. Deswegen wurden diese Monozyten nach oben beschriebener Isolation aus dem Blut für 4 Stunden mit Lipopolysaccharid stimuliert, um so inaktives TF-Protein zu synthetisieren. Die so aktivierten Monozyten wurden anschließend ebenfalls mit HUVEC-Zelllysate inkubiert. Die Zugabe des HUVEC-Zelllysates steigerte die monozytenabhängige FXa-Bildung (Abbildung 11).



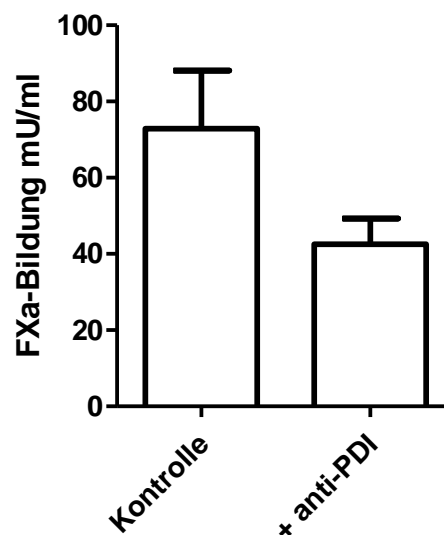
**Abbildung 11: Stimulierung der FXa-Bildung durch aktivierte, intakte Monozyten und HUVEC-Zelllysate**

Nach Isolierung und Aktivierung durch LPS (10 ng/ml) wurden Monozyten (10.000) mit HUVEC-Lysat stimuliert. HUVEC (10.000) wurden mechanisch geschädigt. n = 3. Mittelwerte  $\pm$  S.D. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle (Monozyten).

## III.2 PDI-Analoga und TF-Aktivierung

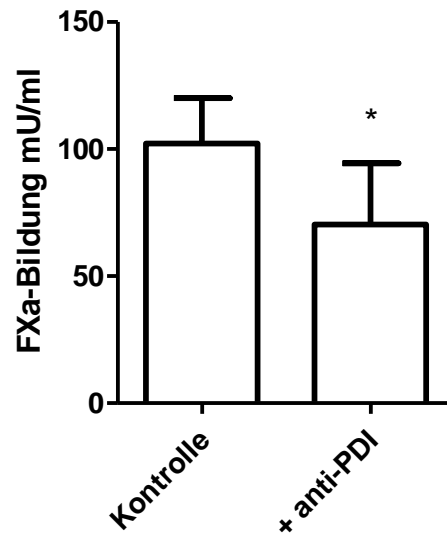
### III.2.1 PDI und ERp57

Nach Zelllyse kommen Enzyme des ER mit Oxidoreduktaseaktivität wie PDI und sein Analogon ERp57 in Kontakt mit Proteinen der Zellmembran. In Vorarbeiten konnte die Beteiligung von PDI bei der TF-Aktivierung gezeigt werden (Reinhardt C et al. 2008). Die durch HUVEC-Zelllysate vermittelte Stimulierung der sTF-abhängigen FXa-Bildung zeigte durch die vorherige Inkubation mit einem anti-PDI-Antikörper eine Tendenz zur Hemmung (Abbildung 12 und 13).



**Abbildung 12: Hemmung der Stimulierung von sTF214 durch anti-PDI-Antikörper**

sTF214 (20 ng/ml) wurde 5 Minuten mit durch Stickstoff lysierten HUVEC (10.000) in Anwesenheit eines anti-PDI-Antikörpers (10 µg/ml) bzw. eines Isotyp-Kontrollantikörpers (10 µg/ml) inkubiert. n = 3. Mittelwerte ± S.D. p = 0,1 vs. Kontrolle.



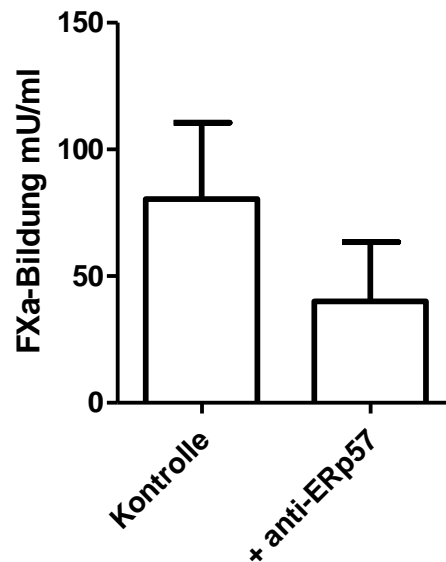
**Abbildung 13: Hemmung der Stimulierung von sTF218 durch anti-PDI-Antikörper**

sTF218 (40 ng/ml) wurde 5 Minuten mit durch Stickstoff lysierten HUVEC (10.000) in Anwesenheit eines anti-PDI-Antikörpers (10 µg/ml) bzw. eines Isotyp-Kontrollantikörpers (10 µg/ml) inkubiert. n = 6. Mittelwerte ± S.D.

\* p<0,05 vs. Kontrolle.

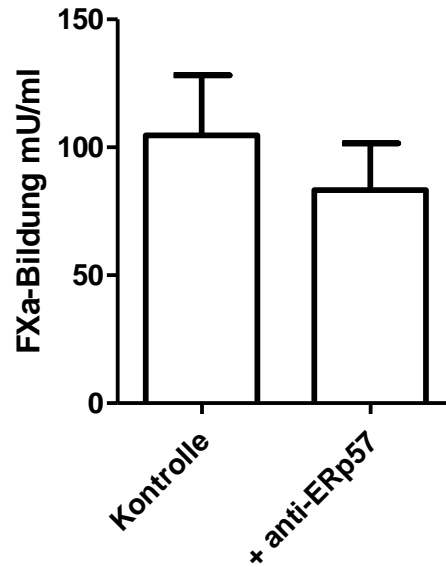
Aufgrund dieser Ergebnisse wurden Analoga von PDI auf deren koagulatorische Potenz untersucht.

Bei den Antikörperhemmversuchen mit anti-ERp75-Antikörpern wurde analog wie oben vorgegangen. In den Versuchen zeigte sich tendenziell eine Hemmung der TF-Aktivität um 20-35% (Abb. 14 und 15).



**Abbildung 14: Hemmung der Stimulierung von sTF214 durch anti-ERp57-Antikörper**

sTF214 (20 ng/ml) wurde 5 Minuten mit durch Stickstoff lysierten HUVEC (10.000) in Anwesenheit eines polyklonalen anti-ERp57-Antikörpers (Verdünnung 1:50) bzw. eines Isotyp-Kontrollantikörpers (10 µg/ml) inkubiert. n = 4. Mittelwerte  $\pm$  S.D. p = 0,34 vs. Kontrolle.



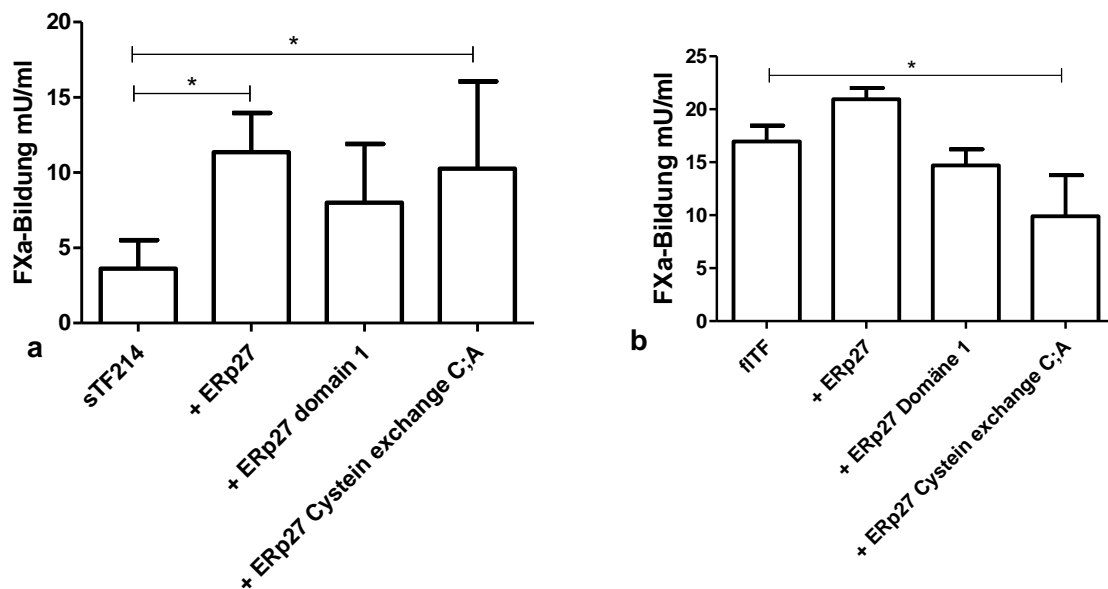
**Abbildung 15: Hemmung der Stimulierung von sTF218 durch anti-ERp57-Antikörper**

sTF218 (40 ng/ml) wurde 5 Minuten mit durch Stickstoff lysierten HUVEC (10.000) in Anwesenheit eines polyklonalen anti-ERp57-Antikörpers (Verdünnung 1:50) bzw. eines Isotyp-Kontrollantikörpers (10 µg/ml) inkubiert. n = 6. Mittelwerte  $\pm$  S.D. p = 0,11 vs. Kontrolle.

Um die Bedeutung von ERp57 weiter zu überprüfen, wurden als nächstes murine embryonale Fibroblasten eingesetzt, die eine Defizienz für die Oxidoreduktase aufwiesen (MEF 2175.C10 57<sup>-/-</sup>). Murine Fibroblasten wurden hier verwendet, da ein humanes Zellmodell mit ERp-57-Defizienz nicht zur Verfügung stand. Dabei zeigte sich im Vergleich mit Wildtypzellen keine signifikante Stimulation der FXa-Bildung. Dabei war es unerheblich, ob die verwendeten MEF lysiert oder intakt waren (Daten nicht gezeigt).

### III.2.2 ERp27 und Mutanten

Ein interessantes Mitglied der PDI-Familie stellt ERp27 dar, da es die Aktivität von sTF214 und fITF in der FXa-Bildung verstärkte (Abb. 16). Im Unterschied zu PDI und ERp57 fehlen bei ERp27 die beiden katalytischen Domänen a und a' mit dem CXXC-Motiv (vergleiche Abb. 4). Auch nach Einsetzen der Mutanten zeigte sich eine Steigerung der FX-Bildung. Beide Domänen von ERp27 sind Strukturanaloge zu den Domänen b und b' von PDI. Eine Mutante ist analog zur Domäne b von PDI (domain1). Bei der anderen Mutante wurden die beiden Cysteine je durch Alanin ersetzt (cystein exchange C:A), nach deren Zugabe sich jeweils eine statistisch signifikante Steigerung zeigte.

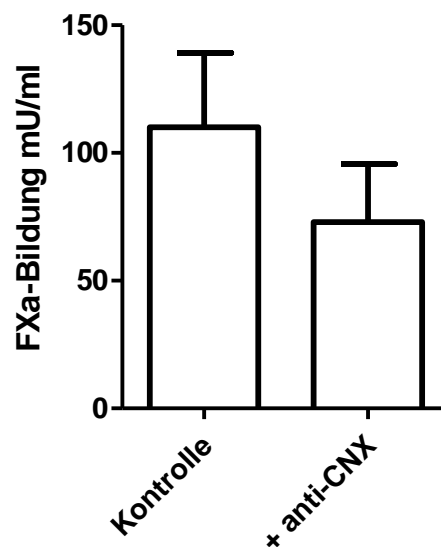


**Abbildung 16: Wirkung von ERp27 auf die TF-Aktivität in der FXa-Bildung**

Getestet wurde der Effekt von ERp27 und den beiden Mutanten ERp27 Domäne 1 und ERp27 (Cys:Ala). Alle Proteine wurden in der Konzentration 1,8  $\mu$ M eingesetzt und 5 Minuten mit den verschiedenen TF-Spezies inkubiert (a) sTF214 20 ng/ml, b) fITF (Innovin®) 1:600). Anschließend wurde die FXa Bildung analysiert. n = 6 (sTF214), n = 3 (fITF). Mittelwerte  $\pm$  S.D. \* p<0,05 vs. Kontrolle (sTF214 bzw. fITF).

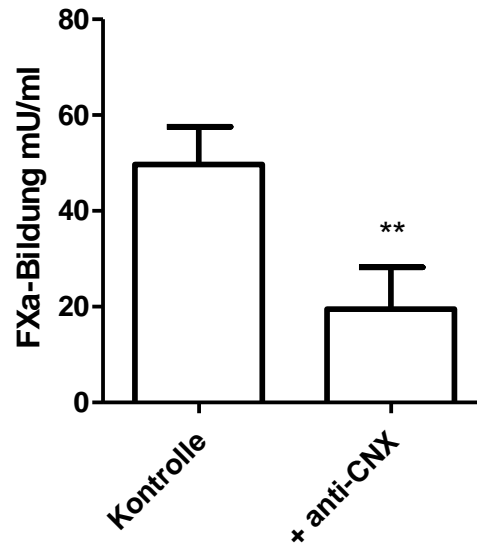
### III.3 Proteine des PLC und TF-Aktivierung

Um die prokoagulatorische Aktivität von CNX zu untersuchen, wurde ein Antikörper verwendet, der gegen die luminal Domäne von CNX gerichtet war (Abb. 17 bis 20). Dabei zeigte sich unter der Verwendung von aktivierten Monozyten, sTF214 und sTF218 als TF-Spezies, die durch HUVEC- und CHO-Zelllysate stimuliert wurden, durch Zugabe des oben genannten Antikörpers im Vergleich zu der Isotyp-Kontrolle ein Trend zur Hemmung der TF-Aktivität. Statistisch signifikant konnte der hemmende Effekt in der Konstellation von sTF218, der durch CHO-Zelllysate stimuliert wurde, gezeigt werden (Abb. 18).



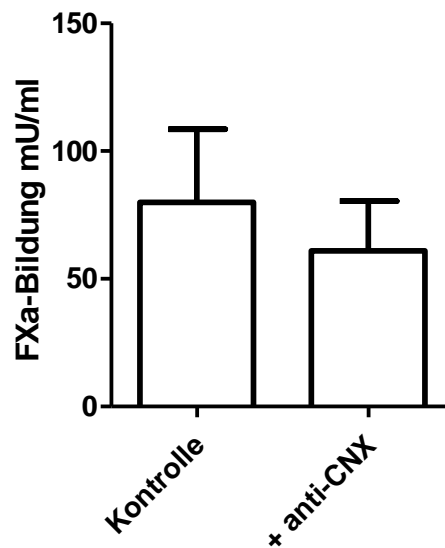
**Abbildung 17: Wirkung eines polyklonalen anti-CNX-Antikörpers auf die prokoagulatorische Aktivität von Monozyten**

LPS-aktivierte Monozyten (10.000 Zellen) wurden mit einem HUVEC-Lysat (10.000 Zellen), das durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen gewonnen wurde, stimuliert und mit einem polyklonalen anti-CNX-Antikörper (Verdünnung 1:50), bzw. dem Isotypantikörper, versetzt und 5 Minuten inkubiert. n = 3. Mittelwerte  $\pm$  S.D. p = 0,2 vs. Kontrolle.



**Abbildung 18: Hemmung der Stimulierung von sTF218 durch anti-CNX-Antikörper**

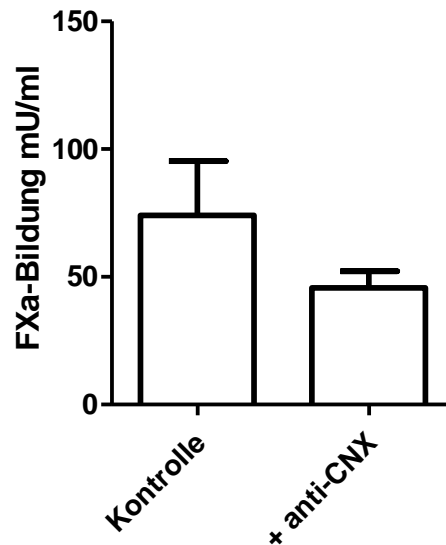
sTF218 (40 ng/ml) wurde 5 Minuten mit durch Stickstoff lysierten CHO (10.000) in Anwesenheit eines monoklonalen anti-CNX-Antikörpers gegen die luminal Domäne von CNX (10 µg/ml) bzw. eines Isotyp-Kontrollantikörpers inkubiert. n = 6. Mittelwerte ± S.D. \*\* p<0,0001 vs. Kontrolle.



**Abbildung 19: Hemmung der Stimulierung von sTF218 durch anti-CNX-Antikörper**

sTF218 (40 ng/ml) wurde 5 Minuten mit durch 30 Pipettenstöße mechanisch geschädigten HUVEC (10.000) in Anwesenheit eines monoklonalen anti-CNX-Antikörpers gegen die luminal Domäne (10 µg/ml) bzw. eines Isotyp-Kontrollantikörpers inkubiert. n = 5. Mittelwerte ± S.D. p = 0,26 vs. Kontrolle.

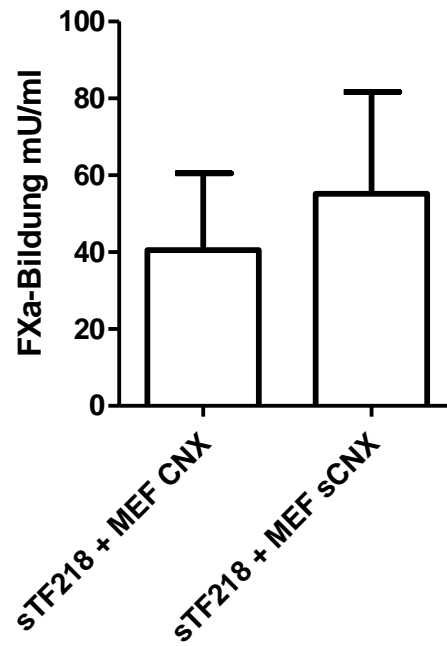




**Abbildung 20: Hemmung der Stimulierung von sTF214 durch anti-CNX-Antikörper**

sTF214 (20 ng/ml) wurde 5 Minuten mit durch Stickstoff lysierten CHO (10.000) in Anwesenheit eines monoklonalen anti-CNX-Antikörpers gegen die luminal Domäne von CNX (10 µg/ml) bzw. eines Isotyp-Kontrollantikörpers inkubiert. n = 6. Mittelwerte  $\pm$  S.D. p = 0,1 vs. Kontrolle.

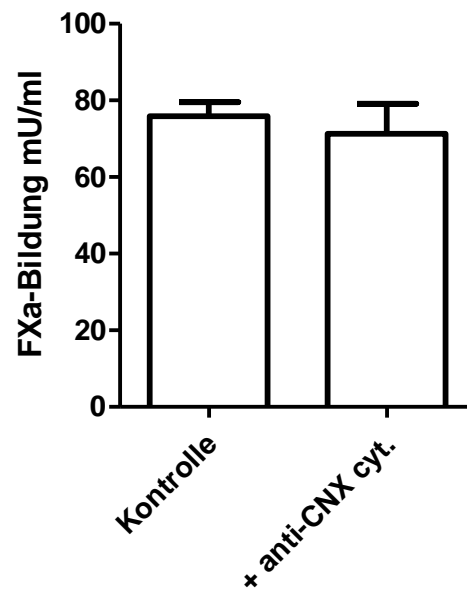
Zur näheren Charakterisierung des Effektes von CNX wurde die Zelllinie MEF WTM1C untersucht (Abb. 21), die eine kürzere Variante von CNX exprimiert (short CNX; sCNX), bei der die Aminosäuren zwischen Lys<sup>104</sup> und Leu<sup>242</sup> fehlen. In diesem Bereich liegen die Bindestellen für Glykane (Tyr<sup>165</sup>, Lys<sup>167</sup>, Tyr<sup>186</sup>, Met<sup>189</sup>, Asp<sup>217</sup>), eine substratbindende Disulfidbrücke (Cys<sup>161</sup>-Cys<sup>195</sup>) und Asp<sup>118</sup>, das ein Ca<sup>2+</sup>-Ion bindet. Deswegen kann sCNX keine unterstützende Funktion bei der Proteinfaltung wahrnehmen. Das Überleben der Zellen ist dadurch nicht eingeschränkt (Pieren M et al. 2005). In den Versuchen zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den TF-stimulierten Aktivitäten beider Zelllinien.



**Abbildung 21: Einfluss der sCNX-exprimierenden MEF-Zellen auf die prokoagulatorische Aktivität von sTF218**

Die sCNX-exprimierende Zelllinie MEF WTM1C (MEF sCNX) (1.000 Zellen) bzw. die entsprechenden Wildtyp-Zellen (MEF CNX) (1.000 Zellen) wurden mit sTF218 (40 ng/ml) inkubiert und danach der FXa-Bildung unterzogen. Die Lyse erfolgte durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen. n = 4. Mittelwerte  $\pm$  S.D. p = 0,48 vs. Kontrolle.

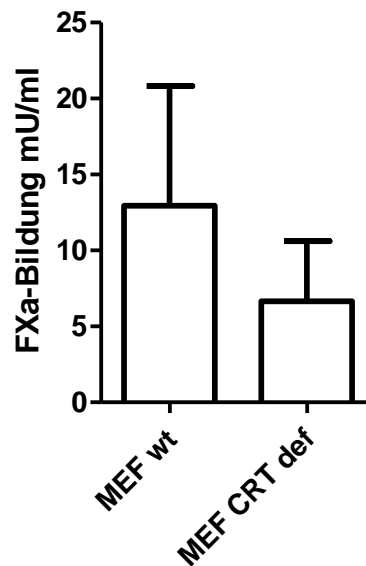
Die Hemmung in der FXa-Bildung konnte ebenso nur bei einem Antikörper gegen die luminaire Domäne von CNX gezeigt werden. Bei der Hemmung der zytoplasmatischen Domäne zeigte sich im Versuchsaufbau keine signifikante Hemmung (Abb. 22).



**Abbildung 22: Hemmung der Stimulierung von sTF218 in Anwesenheit eines Antikörpers gegen die zytoplasmatische Domäne von CNX**

sTF218 (40 ng/ml) wurde 5 Minuten mit durch Stickstoff lysierten CHO (10.000) in Anwesenheit eines monoklonalen anti-CNX-Antikörpers gegen die zytoplasmatische Domäne von CNX (10 µg/ml) bzw. eines Isotyp-Kontrollantikörpers inkubiert. n = 3. Mittelwerte ± S.D. p = 1,0 vs. Kontrolle.

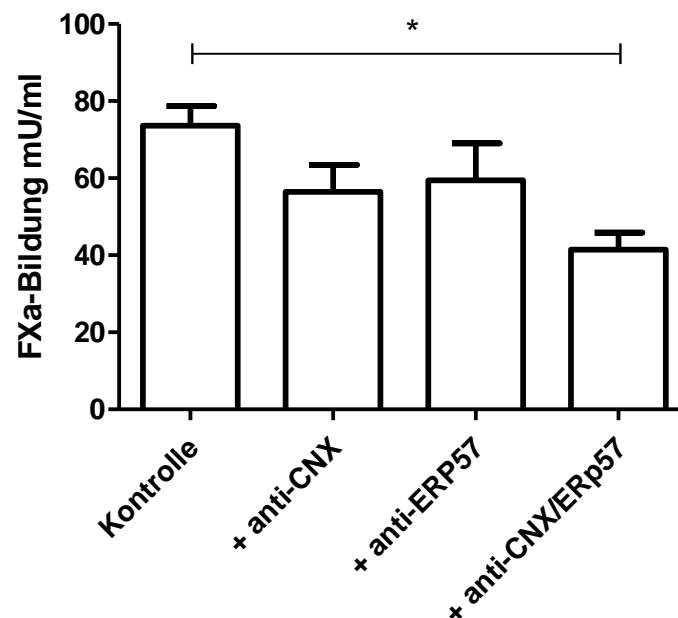
Das Verhalten von CRT als lösliches Analogon von CNX wurde mittels der CRT-defizienten Zelllinie MEF K42 untersucht (Abb. 23). Dabei zeigte sich eine Tendenz zu einer geringer ausgeprägten FXa-Aktivierung in den CRT-defizienten Zellen.



**Abbildung 23: Vergleich CRT-defizienter MEF mit Wildtypzellen**

Verglichen wurde die CRT-defiziente Zelllinie MEF K42 (MEF CRT def) mit dem Wildtyp MEF K41 (MEF wt) in der FXa-Bildung. Dabei wurden je 1000 lysierte Zellen untersucht. Die Lyse erfolgte durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen.  $n = 4$ . Mittelwerte  $\pm$  S.D.  $p = 0,34$  vs. Kontrolle (MEF wt).

In weiteren Experimenten wurden Kombinationen der hemmenden Antikörper gegen Erp57 und die luminale Domäne von CNX in durch CHO-Zelllysate stimulierten sTF-Suspensionen eingesetzt. Dabei bestätigte sich die schon gezeigte Hemmung beim Einsatz des jeweils einzelnen Antikörpers. In der Kombination von anti-CNX und anti-ERP57 in einem Versuchsansatz zeigte sich nach der Stimulation von sTF214 durch CHO-Lysat eine Hemmung von 42% gegenüber der Kontrolle. Dies entspricht ungefähr der Summe aus den Hemmungen der einzeln eingesetzten Antikörper (anti-CNX 25,6% Hemmung, anti-ERP57 21,7% Hemmung) (Abb. 24). Dies deutet auf einen additiven Effekt durch die Hemmung beider Proteine hin.



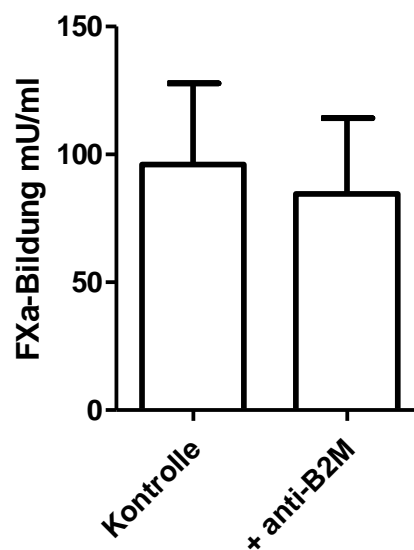
**Abbildung 24: Hemmung der Stimulierung von sTF218 durch Kombination von anti-CNX plus anti-ERP57**

sTF218 (40 ng/ml) wurde 5 Minuten mit durch Stickstoff lysierten CHO (10.000) in Anwesenheit eines monoklonalen anti-CNX-Antikörpers (luminale Domäne 10 µg/ml), eines polyklonalen anti-ERP57-Antikörpers (Verdünnung 1:50) und in der Kombination beider Antikörper inkubiert. n = 3. Mittelwerte ± S.D. \* p<0,05 vs. Kontrolle.

### III.3.1 B2M

B2M bildet die leichte Kette des MHC Klasse I Komplexes und übt stabilisierende Funktionen aus.

Um eine mögliche Beteiligung von B2M an der TF-Aktivierung zu untersuchen, wurde die Aktivierung von TF durch HUVEC-Lysate in Anwesenheit eines Antikörpers gegen B2M getestet (Abb. 25).

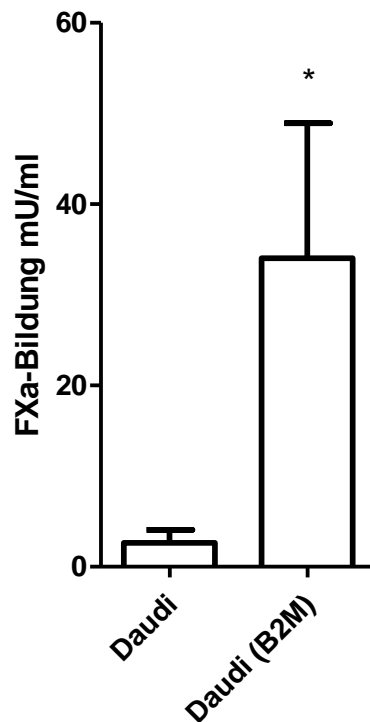


**Abbildung 25: Wirkung des anti-B2M-Antikörpers auf die sTF-Aktivität in Gegenwart von HUVEC-Lysaten**

Verwendet wurde der anti-B2M 01 (anti-B2M) und der Isotyp-Kontrollantikörper in einer Konzentration von je 10 µg/ml. 40 ng/ml sTF218 wurden mit einem Lysat aus 10.000 HUVEC, das durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen gewonnen wurde, stimuliert. n = 5. Mittelwerte ± S.D. p = 0,57 vs. Kontrolle.

Dabei zeigte sich keine Veränderung der TF-Aktivität, wenn B2M gehemmt wurde.

Zur weiteren Charakterisierung des Effekts von B2M auf die TF-Aktivierung wurde das Lysat von B2M-defizienten Daudi-Zellen mit dem Lysat von B2M-retransfizierten Daudi-Zellen verglichen (Abb. 26). Dabei zeigte sich eine deutliche Zunahme der FXa-Aktivität durch die Retransfektante im Vergleich zur B2M-defizienten Daudi-Zelle.



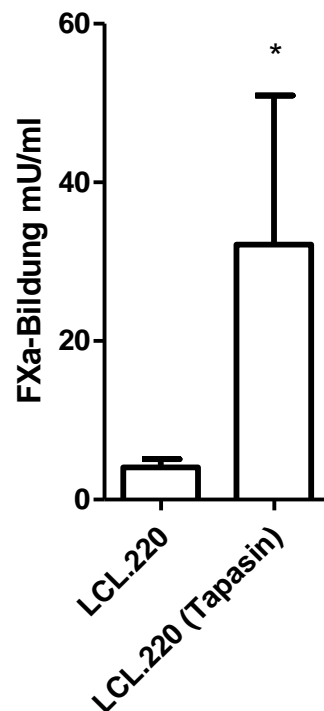
**Abbildung 26: Analyse der prokoagulatorischen B2M-defizienter Daudi-Zellen**

FXa-Bildung nach Lyse von je 10.000 B2M-defizienten Daudi-Zellen und retransfizierten Daudi-Zellen (B2M). Die Lyse erfolgte durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen.

n = 4. Mittelwerte  $\pm$  S.D. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle (Daudi).

### III.3.2 Tapasin

Als zentrales Protein des PLC ist Tapasin für die Rekrutierung von MHC Klasse I und CRT, sowie für die Optimierung der Antigenbeladung zuständig (Abb. 27). Dabei zeigte sich eine deutliche Zunahme der FXa-Aktivität durch die Retransfektante im Vergleich zur Tapasin-defizienten LCL.220-Zelle.



**Abbildung 27: Analyse der prokoagulatorischen Aktivität Tapasin-defizienter LCL.220B\*4402-Zellen**

FXa-Bildung nach Lyse von je 10.000 Tapasin-defizienten LCL.220B\*4402-Zellen (LCL.220) und retransfizierten LCL.220B\*4402+TPN-Zellen (LCL.220 (Tapasin)). Die Lyse erfolgte durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen. n = 4. Mittelwerte  $\pm$  S.D. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle (LCL.220).

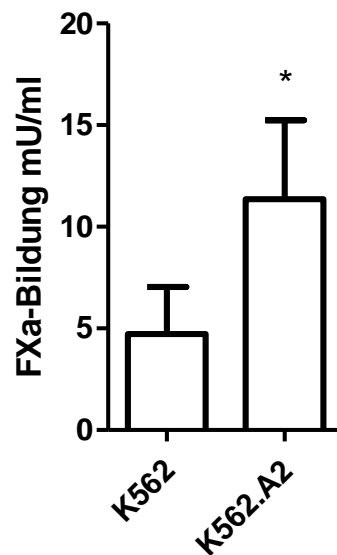
### III.3.3 MHC Klasse I

Ein funktionsfähiges MHC Klasse I Molekül besteht wie schon erwähnt aus einer membrangebundenen schweren und der löslichen leichten Kette B2M, sowie einem gebundenen Peptidfragment, das durch proteasomale Degradation zelleigener, viraler oder tumoraler Proteine entstanden ist. Wir testeten die Wirkung zweier gegen MHC Klasse I gerichteter Antikörper (W6/32 und B9.12.1) auf die prokoagulatorische Aktivität in der FXa-



Bildung. Dabei ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse. Im Falle von W6/32 zeigte sich in der FXa-Bildung eine Stimulierung, im Falle von B9.12.1 eine Inhibierung.

Daher wurden im nächsten Schritt die Lysate der MHC-defizienten Zelllinie K562 und der HLA-A2-retransfizierten Zelllinie K562.A2 miteinander verglichen (Abb. 28).



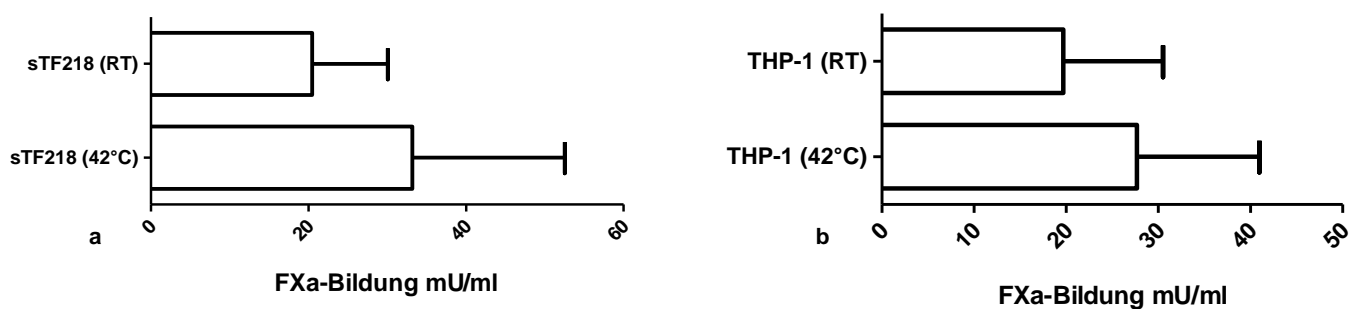
**Abbildung 28: Analyse der prokoagulatorischen Aktivität HLA-A2-defizienter K562-Zellen**

FXa-Bildung nach Lyse von je 10.000 HLA-A2-defizienten K562-Zellen und retransfizierten K562.A2-Zellen. Die Lyse erfolgte durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen. n = 7. Mittelwerte  $\pm$  S.D. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle (K562).

Um zu testen, ob es sich bei den Ergebnissen mit den Lysaten aus Daudi, LCL. 220 und K562 um einen TF-abhängigen Effekt handelt, wurden die Proben in Kontrollversuchen mit 10  $\mu\text{g/ml}$  eines Antikörpers gegen TF (anti-TF VIC7) inkubiert. Dabei zeigte sich eine deutliche Hemmung der FXa-Bildung, so dass von einem TF-abhängigen Effekt ausgegangen werden kann (Daten nicht gezeigt).

### III.4 Auswirkung von pH-Wert und Temperatur auf die TF-Aktivierung

Zur Untersuchung des Einflusses einer Temperaturänderung auf die TF-Aktivierung wurden sTF218 und THP-1-Zellen jeweils für 10 Minuten in einem Wasserbad, das auf eine Temperatur von 42° C kalibriert wurde, inkubiert. Die Kontrollproben wurden bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurden beide Proben mittels FXa-Bildung gemessen. Die Ergebnisse zeigen eine Tendenz zur Aktivitätszunahme von TF bei erhöhter Temperatur (Abb. 29).



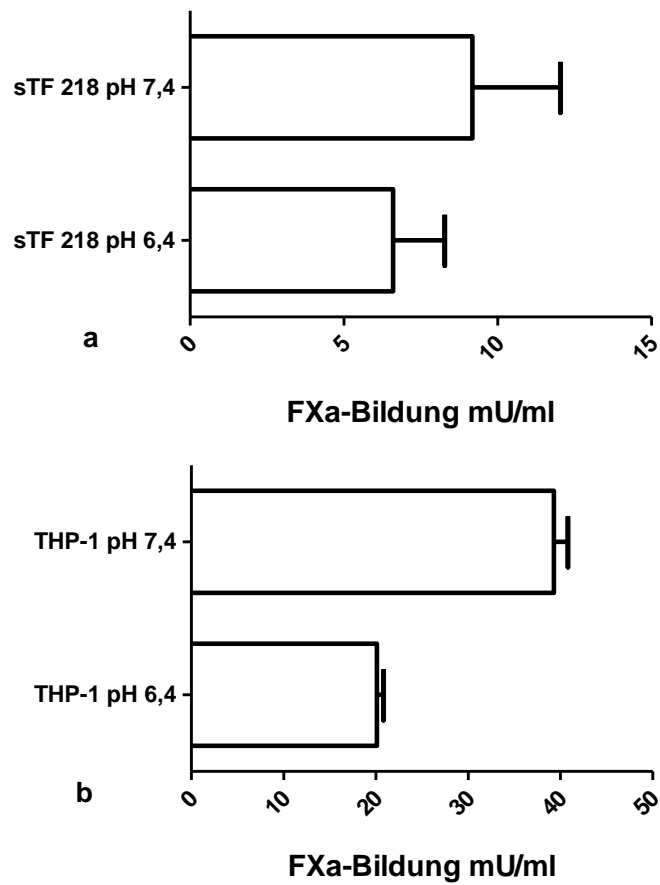
**Abbildung 29: Temperaturabhängigkeit der prokoagulatorischen Aktivität von sTF218 und THP-1**

sTF218 wurde in einer Konzentration von 40 ng/ml eingesetzt und THP-1-Zellen (10.000) wurden verwendet. Beide TF-Spezies wurden im Wasserbad 10 Minuten bei 42° C inkubiert, wohingegen die Vergleichsproben bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend erfolgte die Messung der FXa-Bildung.

a) n = 4. Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. p = 0,88 vs. Kontrolle (RT)

b) n = 4. Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. p = 0,48 vs. Kontrolle (RT)

Um die Effekte einer Azidifizierung auf die TF-Aktivität zu untersuchen, wurden die oben genannten TF-Spezies in einer Suspension mit pH 6,4 inkubiert (Abb. 30). Im Falle von sTF218 zeigte sich im Vergleich zu einer Suspension mit neutralen pH eine Tendenz zur geringer ausgeprägten TF-Aktivität. Im Falle der THP-1-Zellen bewirkte die Azidifizierung eine tendenzielle Verringerung der TF-Aktivität.



**Abbildung 30: pH-Abhängigkeit der prokoagulatorischen Aktivität von sTF218 und THP-1**

sTF218 (40 ng/ml) bzw. THP-1-Zellen (10.000) wurden jeweils für 10 Minuten mit Puffern der angegebenen pH-Werte bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der FXa Bildung.

a)  $n = 4$ . Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.  $p = 0,88$  vs. Kontrolle (pH 7,4).

b)  $n = 3$ . Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.  $p = 0,1$  vs. Kontrolle (pH 7,4).

## IV Diskussion

### IV.1 Stimulierung der prokoagulatorischen Aktivität von TF durch Zelllysate

TF, das Initiatorprotein der Blutgerinnung, liegt in vielen Fällen in einer inaktiven Form vor und bedarf deshalb eines Aktivierungsvorgangs. Inaktiver TF, auch *encrypted* TF genannt, kann nicht nur durch die Anwesenheit negativ geladener Oberflächen, wie sie durch Phosphatidylserin bereitgestellt werden, aktiviert werden, sondern z.B. auch durch posttranslationale Veränderungen des Proteins selbst. Dabei rückten besonders Thiol-Gruppen in den Fokus des Interesses, da durch die Bildung von Disulfid-Brücken allosterische Veränderungen innerhalb eines Proteins erfolgen (Grover SP und Mackmann N 2018), die mit Veränderungen der funktionellen Aktivität einhergehen. Der Einfluss der Thiol-Modifikation auf die Aktivität von TF zeigte sich daran, dass die Oxidoreduktase PDI die TF-Aktivierung stimulierte (Reinhardt C et al. 2008). Demnach benötigt TF einen Stimulus, um seine volle prokoagulatorische Aktivität zu erlangen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Methoden der Lysatherstellung untersucht. Durch den dreimaligen Einfrier- und Auftauprozess kam es zu einer vollständigen Zellschädigung, so dass in der mikroskopischen Begutachtung des Zelllysates keine vitale Zelle, sondern nur Zelldetritus detektiert werden konnte. Bei der Methode der Lysatpräparation durch Ultraschallbehandlung war hingegen noch ein Teil der Zellen in ihrer intakten Form vorhanden. Dennoch zeigte sich auch nach Ultraschallbehandlung eine Zunahme der prokoagulatorischen Aktivität. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die intakten Zellen nach Verletzung gerinnungsaktive Mikropartikel freisetzen (Chen P et al. 2012; Van Wijk et al. 2003), die z.B. Kandidaten zur TF-Aktivierung transportieren, oder diese Kandidaten an der Zelloberfläche geschädigter Zellen präsentiert werden. Bei der vollständigen Zellschädigung durch Einfrieren und Auftauen kommt es zur Ruptur der Zellmembranbarriere und zum Herauslösen von intrazellulären Proteinen und anderer Zellbestandteilen aus dem ursprünglichen Kontext. So erhalten die intrazellulären Proteine neue Interaktionspartner, wie z.B. extrazelluläre Domänen von Zellmembranproteinen im Fall von TF, die intakten Zellen nicht zur Verfügung stehen. Diese neuen Interaktionen könnten von Bedeutung sein für die Gerinnungsaktivierung durch mechanisch verletzte Zellen.

## **IV.2 PDI und PDI-Analoga als TF-Aktivatoren**

Die Zelllyse dient in der vorliegenden Arbeit demnach als Modell für die Schädigung von Zellen, wie sie bei einer Gefäßverletzung vorkommt. Eine schnelle und flexibel gesteuerte Hämostase ist notwendig, um den Gesamtorganismus gegenüber einem Blutverlust zu schützen. Nach vollständiger Lyse wird u.a. auch das endoplasmatische Retikulum geschädigt. So ist bekannt, dass Thiol-Isomerasen, wie PDI und PDI-Analoga, in den Extrazellularraum freigesetzt werden. Jedoch sind die genauen Freisetzungsmechanismen dieser ER-Proteine noch unbekannt (Furie B et al. 2014). Eine Erklärung wäre, dass alleine die Zellschädigung zu einer Freisetzung von PDI und dessen Analoga führt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation durch Thrombin ebenfalls eine Sekretion von PDI aus HUVEC bedingt (Jasuja R et al. 2010).

Anhand der Bildung von FXa konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Anwesenheit eines neutralisierenden Antikörpers gegen PDI oder ERp57 die durch TF vermittelte prokoagulatorische Aktivität hemmt, so dass während des Stimulationsprozesses weniger aktiver TF gebildet wird. In prinzipieller Übereinstimmung mit diesen Befunden konnte die Arbeitsgruppe um David W. Essex durch selektive Hemmung von ERp57 eine Zunahme der Blutungszeit und eine Abnahme der Thrombenbildung unter in vivo-Bedingungen zeigen (Wu Y et al. 2012).

Abgesehen von PDI und ERp57 wurde die Aktivität von sTF214 auch durch das ER-Protein ERp27 stimuliert. Die Domänenstruktur von ERp27 ist prinzipiell analog zum Aufbau von PDI. Es fehlen aber bei ERp27 die für PDI charakteristischen katalytischen CXXC-Domänen. Jedoch bindet ERp27 z.B. genauso wie PDI das Indikatorprotein  $\Delta$ -Somatostatin für ungefaltete oder teilweise gefaltete Proteine (Alanen HI et al. 2006). Auch eine Assoziation zwischen ERp27 und ERp57 wurde beschrieben, welches sowohl CNX als auch CRT binden kann. Ein trimerer Komplex aus ERp27, ERp57 und z.B. CNX ist jedoch nicht möglich (Alanen HI et al. 2006).

## **IV.3 Rolle des PLC bei der posttranslationalen TF-Aktivierung**

Da neben PDI auch ERp57 die prokoagulatorische Aktivität stimuliert, wurden auch die mit den beiden Oxidoreduktasen innerhalb des PLC assoziierten Lektine CNX und CRT untersucht. Die antikörpervermittelte Hemmung der luminalen, nicht jedoch der zytoplasmatischen Domäne von CNX induzierte eine Abnahme der TF-Aktivität. Im direkten

Vergleich von Wildtyp-Zellen und CRT-defizienten Zellen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der FXa-Bildung. Jedoch war eine Tendenz zur Hemmung in der CRT-defizienten Zelllinie zu erkennen.

Aus den Experimenten lassen sich demnach Hinweise ableiten, dass CNX die TF-Aktivierung beeinflusst. Zwei Mechanismen sind dabei denkbar:

1. Die Glykosylierung von TF könnte zu einer besseren Interaktion mit ERp57 und damit zu einer TF-Cysteinmodifikation führen, wie sie auch durch PDI induziert wird: Die Aminosäuresequenz von TF beinhaltet vier potentielle N-Glykosylierungsmöglichkeiten: drei extrazelluläre (Asn<sup>11</sup>, Asn<sup>124</sup>, Asn<sup>137</sup>) und eine intrazelluläre (Asn<sup>26</sup>). Asn<sup>26</sup> ist zumeist nicht glykosyliert, so dass für entsprechende Interaktionen nur die extrazellulären Domänen in Frage kommen (Paborsky LR und Harris RJ 1990). Die Glykosylierung selbst hat keinen prokoagulatorischen Effekt. Dies konnte bereits durch TF-Mutanten gezeigt werden, bei denen in der Primärstruktur Asparagin an den Positionen 11, 124, 137 und 26 durch Alanin ersetzt wurden (Kothari H et al. 2011). Das heißt demnach, dass die Glykosylierungssequenzen von den Lektinen CNX und CRT erkannt werden und es zu einer Assoziation mit ERp57 kommt, welches dann durch seine Oxidoreduktaseaktivität das Cysteinpaaar Cys<sup>186</sup>-Cys<sup>209</sup> von TF modifiziert, wodurch letztlich TF aktiviert wird.

2. Allosterischer Effekt: Denkbar wäre auch, dass TF durch die Interaktion mit CNX und CRT strukturell besser an FVIIa binden kann oder dass der Aktivatorkomplex TF-FVIIa besser mit FX interagieren kann.

Die erwähnten Oxidoreduktasen und Lektine sind Bestandteile des PLC. Tapasin ist ein zentrales PLC-stabilisierendes Molekül, das eine kovalente Bindung mit ERp57 eingeht. In Tapasin-defizienten Zellen, in denen MHC Klasse I-Moleküle nicht korrekt synthetisiert werden, zeigte sich eine signifikante Hemmung in der FXa-Bildung. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass durch den Mangel an Tapasin TF-Aktivatoren wie PDI nicht mit TF interagieren können. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese war die prokoagulatorische Aktivität in Zellen ebenso vermindert, die defizient für MHC Klasse I-Moleküle und B2M waren.

#### **IV.4 Physikalische Einflüsse auf die TF-Aktivierung**

Neben einer Vielzahl von Proteinen und Enzymen kann es in Verletzungsarealen durch die konsekutive Entzündungsreaktion zu Veränderungen der Temperatur und des pH-Wertes im Wundmilieu kommen. Die Ergebnisse zeigen lediglich eine Tendenz ohne statistische Signifikanz hinsichtlich der Zunahme der TF-Aktivität nach einer Wärmebehandlung in vitro.

Beim pH-Wert zeigte sich eine gegenteilige Entwicklung. Die TF-Aktivität war im sauren pH-Bereich reduziert. Dies kann darauf hindeuten, dass es im sauren pH-Bereich zu einer partiellen Denaturierung von TF kommt.

#### **IV.5 Kritische Auseinandersetzung mit den angewandten Methoden**

Ziel der Arbeit war es, neue Kandidaten für die posttranslationale TF-Aktivierung zu identifizieren. Dabei wurde ein relativ einfaches und effizientes Wundmodell gewählt, bei dem die terminale Zellschädigung im Zentrum steht. Während des TF-Aktivierungsprozesses wurden gezielt einzelne Bestandteile des Lysates gehemmt, um deren Effekt auf die FXa-Bildung zu dokumentieren. Dabei konnten neue Hinweise auf verschiedene prokoagulatorische Kandidatenmoleküle gefunden werden.

In zukünftigen Untersuchungen sollten die hier beobachteten in vitro-Ergebnisse durch geeignete in vivo-Experimente bestätigt werden.

#### **IV.6 Ausblick**

In der Zusammenschau der Ergebnisse ist abzuleiten, dass die Aktivierung von TF kein monofaktorieller Prozess ist. Einzelne prokoagulatorische Aktivatoren, die mit TF interagieren, wie z.B. Phosphatidylserin, PDI, ERp57, die Lektine CNX und CRT oder der PLC, können alleine die volle prokoagulatorische Wirksamkeit von TF nicht erklären. So ist es wahrscheinlich, dass in der Situation eines Blutverlustes eine ganze Reihe an Schutzmechanismen zu einer suffizienten TF-Aktivierung führen müssen, um einen kritischen Blutverlust zu verhindern. Innerhalb dieses evolutionären Schutzmechanismus zeichnet sich ab, dass TF nicht den Beginn der Gerinnungskaskade darstellt, jedoch die erste Zielstruktur multifaktorieller Aktivierungsmechanismen bildet.

## V Zusammenfassung

TF ist zentral bei der Initiierung des Koagulationsprozesses im Rahmen der extrinsischen Blutgerinnung. Vorarbeiten zeigten, dass TF jedoch nicht an der Spitze der Blutgerinnungskaskade steht, da TF selbst aktiviert werden muss. Seit bekannt ist, dass die im ER lokalisierte Oxidoreduktase PDI TF aktivieren kann, erfolgte in der vorliegenden Arbeit ein umfangreiches Screening an ER-Kandidatenproteinen, um neue TF-Aktivatoren zu charakterisieren.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass Zelllysate, die eine Vielzahl an unterschiedlichen möglichen Interaktionspartner für TF zu Verfügung stellen, TF direkt aktivieren. Ausgehend davon wurden nun unterschiedliche Kandidaten - zunächst die mit PDI analoge Oxidoreduktase ERp57 - untersucht. Sowohl ERp57 als auch ERp27 konnten TF aktivieren.

Da Oxidoreduktasen auch Mitglieder des PLC sind, lag es nahe, auch die weiteren Bestandteile des PLC zu untersuchen. Dabei zeigten sich in der Untersuchung defizienter Zellen für Tapasin, B2M und HLA-A2 verglichen mit retransfizierten bzw. Wildtyp-Zellen jeweils eine statistisch signifikante Hemmung, die durch die Untersuchung mit einem spezifischen anti-TF-Antikörper einen TF-abhängigen Prozess bestätigten. Auch bei der Untersuchung des ERp57-assoziierten Lektins CNX zeigte sich in den Antikörperhemmversuchen eine deutliche Reduktion der TF-Aktivität in der FXa-Bildung. Dies konnte aber nur nach Hemmung der luminalen Domäne von CNX gezeigt werden, nicht aber beim Einsatz eines hemmenden Antikörpers gegen die zytoplasmatische Domäne. Auch eine Untersuchung des löslichen Analogons CRT zeigte keine Effekte. Lediglich in der vergleichenden Untersuchung mit CRT-retransfizierten embryonalen Fibroblasten von der Maus zeigte sich eine Tendenz, dass auch CRT in der FXa-Bildung eine Rolle spielen könnte.

Neben den ER-Proteinen wurden auch physikalische Einflüsse auf die TF-Aktivität untersucht, wie sie innerhalb von Wunden beobachtet werden. Dabei zeigte sich, dass erhöhte Temperaturen und ein verminderter pH-Wert die TF-Aktivität steigern bzw. hemmen.

Insgesamt zeigte sich, dass es weiterer Untersuchungen bedarf, um die Mechanismen der TF-Aktivierung genauer aufzuklären, damit diese Erkenntnisse auch bei der therapeutischen Anwendung, z.B. zur Vermeidung und Behandlung tiefer Beinvenenthrombosen, eingesetzt werden können.



## VI Summary

TF is crucial for initiating the blood coagulation process by triggering the extrinsic pathway. Previous work suggested that TF is not the very first starter protein of the coagulation cascade as it needs to be itself activated. Since it is known that PDI, an ER protein, is able to activate TF, in the present study a detailed screening of ER candidate proteins was performed to characterize new TF activators.

As a first step it could be shown, that cell lysates, which provide several ER-associated partners for interaction with TF, could activate TF.

In a second step, the role of different ER candidate proteins - including PDI family members such as ERp57 - was investigated. Both ERp57 and ERp27 were found to enhance TF activation. With oxidoreductases being part of the PLC, a closer look on other components of the PLC was necessary. Examining cells deficient for tapasin, B2M or HLA-A2, a statistically significant inhibition of factor Xa formation was observed, which was proven to be TF-dependent by use of specific anti-TF-antibody.

Also the ERp57-associated lectin CNX appeared to regulate TF activation. Indeed, an antibody specifically targeting the luminal domain of CNX inhibited TF activity. An antibody targeting the cytoplasmic domain of CNX showed no effect. Also the soluble analogon of CNX, CRT, was without effect. Nonetheless, experiments with CRT-retransfected embryonal mouse fibroblasts suggested that CRT might potentially play a role in factor Xa formation.

Next to the ER-proteins, physical influences on TF activity, as potentially observed in a wound, were investigated. In this context, it was shown that increases in temperature above 37° C enhanced TF activity. In contrast low pH values decreased TF activity.

Overall, more examinations need to be performed to illuminate the mechanisms of TF-activation in detail, in particular in order to translate these findings into a therapeutic scenario, such as for example for treatment of deep vein thrombosis.

## VII Literatur

- **Alanen HI, Williamson RA, Howard MJ, Hatahet FS, Salo KE, Kauppila A, Kellokumpu S, Ruddock LW:** ERp27, a new non-catalytic endoplasmic reticulum-located human protein disulfide isomerase family member, interacts with ERp57. *J Biol Chem* 2006 Nov; 281(44):33727-38
- **Andersson HM, Arantes MJ, Crawley JT, Luken BM, Tran S, Dahlbäck B, Lane DA, Rezende SM:** Activated protein C cofactor function of protein S: a critical role for Asp95 in the EGF1-like domain. *Blood* 2010 Jun; 115(23): 4878-85
- **Apostolopoulos V, Yuriev E, Lazoura E, Yu M, Ramsland PA:** MHC and MHC-like molecules: structural perspectives on the design of molecular vaccines. *Hum Vaccin* 2008 Nov-Dec; 4(6): 400-9
- **Ashish N Rao, Nayef M Kazzaz, Jason S Knight:** Do neutrophil extracellular traps contribute to the heightened risk of thrombosis in inflammatory diseases? *World J Cardiol.* 2015 Dec 26; 7(12): 829–842
- **Barlogie B, Epstein J, Selvanayagam P, Alexanian R:** Plasma cell myeloma--new biological insights and advances in therapy. *Blood* 1989 Mar; 73(4): 865-79
- **Bedford L, Paine S, Sheppard PW, Mayer RJ, Roelofs J:** Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends Cell Biol* 2010 Jul; 20(7): 391-401
- **Belting M, Dorrell MI, Sandgren S, Aguilar E, Ahamed J, Dorfleutner A, Carmeliet P, Mueller BM, Friedlander M, Ruf W:** Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. *Nat Med* 2004 May; 10(5): 502-9
- **Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y:** Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med* 2003 Apr; 9(4): 458-62
- **Breitenstein A, Tanner FC, Lüscher TF:** Tissue factor and cardiovascular disease: quo vadis? *Circ J* 2010; 74(1):3-12
- **Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A:** Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004 Mar 5;303(5663):1532-5
- **Brummel KE, Paradis SG, Butenas S, Mann KG:** Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood* 2002; 100(1):148-52
- **Butenas S, Mann KG:** Blood coagulation. *Biochemistry (Mosc)* 2002; 67(1):3-12

- **Butenas S, Orfeo T, Mann KG:** Tissue factor in coagulation: Which? Where? When? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 Dec; 29(12): 1989-96
- **Butenas S, van 't Veer C, Mann KG:** Evaluation of the initiation phase of blood coagulation using ultrasensitive assays for serine proteases. *J Biol Chem* 1997; 272(34): 21527-33
- **Camerer E, Huang W, Coughlin SR:** Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 May; 97(10): 5255-60
- **Cimmino G, Golino P, Badimon JJ:** Pathophysiological role of blood-borne tissue factor: should the old paradigm be revisited? *Intern Emerg Med* 2011 Feb; 6(1): 29-34
- **Chen P, Douglas SD, Meshki J, Tuluc F:** Neurokinin 1 receptor mediates membrane blebbing and shear stress-induced microparticle formation in HEK293 cells. *PLoS One*. 2012; 7(9):e45322
- **Coughlin SR, Camerer E:** PARTicipation in inflammation. *J Clin Invest* 2003 Jan; 111(1): 25-7
- **Danese S, Vetrano S, Zhang L, Poplis VA, Castellino FJ:** The protein C pathway in tissue inflammation and injury: pathogenic role and therapeutic implications. *Blood* 2010 Feb; 115(6): 1121-30
- **Daubie V, Pochet R, Houard S, Philippart P:** Tissue factor: a mini-review. *J Tissue Eng Regen Med* 2007 May-Jun; 1(3): 161-9
- **Dong G, Wearsch PA, Peaper DR, Cresswell P, Reinisch KM:** Insights into MHC class I peptide loading from the structure of the tapasin-ERp57 thiol oxidoreductase heterodimer. *Immunity* 2009 Jan 16; 30(1): 21-32
- **Dorfleutner A, Ruf W:** Regulation of tissue factor cytoplasmic domain phosphorylation by palmitoylation. *Blood* 2003 Dec; 102(12): 3998-4005
- **Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS:** Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 1989 May; 134(5): 1087-97
- **Drake TA, Ruf W, Morrissey JH, Edgington TS:** Functional tissue factor is entirely cell surface expressed on lipopolysaccharide-stimulated human blood monocytes and a constitutively tissue factor-producing neoplastic cell line. *J Cell Biol* 1989 Jul; 109(1): 389-95

- **Eichner T, Radford SE:** Understanding the complex mechanisms of  $\beta$ 2-microglobulin amyloid assembly. *FEBS J* 2011 Oct;278(20): 3868-83
- **Eilertsen KE, Østerud B:** Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004 Oct; 15(7): 521-38
- **Ellgaard L, Ruddock LW:** The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep* 2005 Jan; 6(1): 28-32
- **Fiore MM, Neuenschwander PF, Morrissey JH:** The biochemical basis for the apparent defect of soluble mutant tissue factor in enhancing the proteolytic activities of factor VIIa. *J Biol Chem* 1993; 269: 143-149
- **Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, Alden E, Patel-Hett SR, Battinelli E, Klement GL, Sola-Visner M, Italiano JE Jr:** Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood* 2009 Jan; 113(5): 1112-21
- **Furie B, Flaumenhaft R:** Thiol isomerases in thrombus formation. *Circ Res.* 2014 Mar 28; 114(7): 1162-73
- **Garbi N, Tan P, Diehl AD, Chambers BJ, Ljunggren HG, Momburg F, Hämmerling GJ:** Impaired immune responses and altered peptide repertoire in tapasin-deficient mice. *Nat Immunol* 2000 Sep; 1(3): 234-8
- **Geddings JE, Hisada Y, Boulaftali Y, Getz TM, Whelihan M, Fuentes R, Dee R, Cooley BC, Key NS, Wolberg AS, Bergmeier W, Mackman N:** Tissue factor-positive tumor microvesicles activate platelets and enhance thrombosis in mice. *J Thromb Haemost.* 2016 Jan; 14(1): 153-66
- **Girolami A, Randi ML, Gavasso S, Lombardi AM, Spiezia F:** The occasional venous thromboses seen in patients with severe (homozygous) FXII deficiency are probably due to associated risk factors: a study of prevalence in 21 patients and review of the literature. *J Thromb Thrombolysis* 2004 Apr; 17(2): 139-43
- **Grover SP, Mackman N:** Tissue Factor: An Essential Mediator of Hemostasis and Trigger of Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018 Apr;38(4):709-725
- **Guha M, Mackman N:** LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 2001 Feb; 13(2): 85-94

- **Hackeng TM, Seré KM, Tans G, Rosing J:** Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Feb; 103(9): 3106-11
- **Harlos K, Martin DM, O'Brien DP, Jones EY, Stuart DI, Polikarpov I, Miller A, Tuddenham EG, Boys CW:** Crystal structure of the extracellular region of human tissue factor. *Nature* 1994 Aug; 370(6491): 662-6
- **Hatahet F, Ruddock LW:** Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal* 2009 Nov; 11(11): 2807-50
- **Hebert DN, Molinari M:** In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev* 2007 Oct; 87(4): 1377-408
- **Hermans J, McDonagh J:** Fibrin: structure and interactions. *Semin Thromb Hemost* 1982; 8(1): 11-24
- **Hisada Y, Thålin C, Lundström S, Wallén H, Mackman N:** Comparison of microvesicle tissue factor activity in non-cancer severely ill patients and cancer patients. *Thromb Res.* 2018 Mar 7;165: 1-5
- **Ihara Y, Cohen-Doyle MF, Saito Y, Williams DB:** Calnexin discriminates between protein conformational states and functions as a molecular chaperone in vitro. *Mol Cell* 1999 Sep; 4(3): 331-41
- **Jasuja R, Furie B, Furie BC:** Endothelium-derived but not platelet-derived protein disulfide isomerase is required for thrombus formation in vivo. *Blood.* 2010 Nov 25; 116(22): 4665-74
- **Kao FT, Hartz J, Horton R, Nemerson Y, Carson SD:** Regional assignment of human tissue factor gene (F3) to chromosome 1p21-p22. *Somat Cell Mol Genet* 1988 Jul; 14(4): 407-10
- **Kasthuri RS, Glover SL, Boles J, Mackman N:** Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor as key regulators of global hemostasis: measurement of their levels in coagulation assays. *Semin Thromb Hemost* 2010 Oct; 36(7): 764-71
- **Keuren JF, Wielders SJ, Ulrichs H, Hackeng T, Heemskerk JW, Deckmyn H, Bevers EM, Lindhout T:** Synergistic effect of thrombin on collagen-induced platelet procoagulant activity is mediated through protease-activated receptor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 ;25(7): 1499-505

- **Kirchhofer D, Lipari MT, Moran P, Eigenbrot C, Kelley RF:** The tissue factor region that interacts with substrates factor IX and Factor X. *Biochemistry* 2000 Jun; 39(25): 7380-7
- **Kluft C, Dooijewaard G, Emeis JJ:** Role of the contact system in fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost* 1987 Jan; 13(1): 50-68.
- **Kothari H, Rao LV, Pendurthi UR:** Glycosylation of tissue factor is not essential for its transport or functions. *J Thromb Haemost.* 2011 Aug; 9(8): 1511-20.
- **Kozlov G, Bastos-Aristizabal S, Määttänen P, Rosenauer A, Zheng F, Killikelly A, Trempe JF, Thomas DY, Gehring K:** Structural basis of cyclophilin B binding by the calnexin/calreticulin P-domain. *J Biol Chem* 2010 Nov 12; 285(46): 35551-7
- **Kujovich JL:** Factor V Leiden Thrombophilia. *Genet Med* 2011 Jan; 13(1): 1-16
- **Lane DA, Philippou H, Huntington JA:** Directing thrombin. *Blood* 2005 Oct 15; 106(8): 2605-12
- **Leach MR, Cohen-Doyle MF, Thomas DY, Williams DB:** Localization of the lectin, ERp57 binding, and polypeptide binding sites of calnexin and calreticulin. *J Biol Chem* 2002 Aug 16; 277(33): 29686-97
- **Li S, Sjögren HO, Hellman U, Pettersson RF, Wang P:** Cloning and functional characterization of a subunit of the transporter associated with antigen processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Aug 5; 94(16): 8708-13
- **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ:** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951 Nov; 193(1): 265-75
- **Mackman N, Tilley RE, Key NS:** Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(8): 1687-93
- **Manukyan D, von Bruehl ML, Massberg S, Engelmann B:** Protein disulfide isomerase as a trigger for tissue factor-dependent fibrin generation. *Thromb Res* 2008; 122 Suppl 1: S19-22
- **Maugeri N, Manfredi AA:** Tissue Factor Expressed by Neutrophils: Another Piece in the Vascular Inflammation Puzzle. *Semin Thromb Hemost* 2015 Oct; 41(7): 728-36
- **McCallum CD, Hapak RC, Neuenschwander PF, Morrissey JH, Johnson AE:** The location of the active site of blood coagulation factor VIIa above the membrane surface and its reorientation upon association with tissue factor. A fluorescence energy transfer study. *J Biol Chem* 1996 Nov; 271(45): 28168-75

- **Minazzo AS, Darlington RC, Ross JB:** Loop dynamics of the extracellular domain of human tissue factor and activation of factor VIIa. *Biophys J* 2009 Jan; 96(2): 681-92
- **Moosbauer C, Morgenstern E, Cuvelier SL, Manukyan D, Bidzhekov K, Albrecht S, Lohse P, Patel KD, Engelmann B:** Eosinophils are a major intravascular location for tissue factor storage and exposure. *Blood* 2007 Feb 1; 109(3): 995-1002
- **Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, Freyssinet JM:** Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 Dec; 26(12): 2594-604
- **Morrissey JH:** Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. *Thromb Haemost* 2001 Jul; 86(1): 66-74
- **Morrissey JH, Macik BG, Neuenschwander PF, Comp PC:** Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood* 1993 Feb; 81(3): 734-44
- **Morrissey JH, Pureza V, Davis-Harrison RL, Sligar SG, Rienstra CM, Kijac AZ, Ohkubo YZ, Tajkhorshid E:** Protein-membrane interactions: blood clotting on nanoscale bilayers. *J Thromb Haemost* 2009; 7 Suppl 1: 169-72
- **Müller F, Mutch NJ, Schenk WA, Smith SA, Esterl L, Spronk HM, Schmidbauer S, Gahl WA, Morrissey JH, Renné T:** Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell* 2009 Dec; 139(6): 1143-56
- **Müller I, Klocke A, Alex M, Kotzsch M, Luther T, Morgenstern E, Zieseniss S, Zahler S, Preissner K, Engelmann B:** Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J* 2003 Mar; 17(3): 476-8
- **Olsen OH, Persson E:** Cofactor-induced and mutational activity enhancement of coagulation factor VIIa. *Cell Mol Life Sci* 2008 Mar; 65(6): 953-63
- **Olsen OH, Rand KD, Østergaard H, Persson E:** A combined structural dynamics approach identifies a putative switch in factor VIIa employed by tissue factor to initiate blood coagulation. *Protein Sci* 2007 Apr; 16(4): 671-82
- **Ortmann B, Copeman J, Lehner PJ, Sadasivan B, Herberg JA, Grandea AG, Riddell SR, Tampé R, Spies T, Trowsdale J, Cresswell P:** A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* 1997 Aug 29; 277 (5330): 1306-9

- **Osterlund M, Persson E, Carlsson U, Freskgård PO, Svensson M:** Sequential coagulation factor VIIa domain binding to tissue factor. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Dec; 337(4): 1276-82
- **Ott I:** Inhibitors of the initiation of coagulation. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2011 Oct; 72(4):547-52
- **Paborsky LR, Harris RJ:** Post-translational modifications of recombinant human tissue factor. *Thromb Res.* 1990 Dec 1; 60(5):367-76
- **Panter MS, Jain A, Leonhardt RM, Ha T, Cresswell P:** Dynamics of major histocompatibility complex class I association with the human peptide-loading complex. *J Biol Chem* 2012 Sep 7; 287(37): 31172-84
- **Patnaik MM, Moll S:** Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia* 2008 Nov; 14(6): 1229-39
- **Paulsson KM, Wang P:** Quality control of MHC class I maturation. *FASEB J* 2004 Jan; 18(1): 31-8
- **Pieren M, Galli C, Denzel A, Molinari M:** The use of calnexin and calreticulin by cellular and viral glycoproteins. *J Biol Chem* 2005 Aug 5; 280(31): 28265-71
- **Pocanschi CL, Kozlov G, Brockmeier U, Brockmeier A, Williams DB, Gehring K:** Structural and functional relationships between the lectin and arm domains of calreticulin. *J Biol Chem* 2011 Aug 5; 286(31): 27266-77
- **Rand KD, Jørgensen TJ, Olsen OH, Persson E, Jensen ON, Stennicke HR, Andersen MD:** Allosteric activation of coagulation factor VIIa visualized by hydrogen exchange. *J Biol Chem* 2006 Aug; 281(32): 23018-24
- **Reinhardt C, von Brühl ML, Manukyan D, Grahl L, Lorenz M, Altmann B, Dlugai S, Hess S, Konrad I, Orschiedt L, Mackman N, Ruddock L, Massberg S, Engelmann B:** Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *J Clin Invest* 2008 Mar; 118(3): 1110-22
- **Renné T, Pozgajová M, Grüner S, Schuh K, Pauer HU, Burfeind P, Gailani D, Nieswandt B:** Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med* 2005 Jul 18; 202(2): 271-81
- **Rodgers GM:** Role of antithrombin concentrate in treatment of hereditary antithrombin deficiency. An update. *Thromb Haemost* 2009 May; 101(5): 806-12



- **Røder G, Geironsen L, Bressendorff I, Paulsson K:** Viral proteins interfering with antigen presentation target the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex. *J Virol* 2008 Sep; 82(17): 8246-52
- **Ruiz FA, Lea CR, Oldfield E, Docampo R:** Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. *J Biol Chem.* 2004 Oct 22;279(43): 44250-7
- **Salem HH, Esmon NL, Esmon CT, Majerus PW:** Effects of thrombomodulin and coagulation Factor Va-light chain on protein C activation in vitro. *J Clin Invest* 1984 Apr; 73(4): 968-72
- **Santos SG, Campbell EC, Lynch S, Wong V, Antoniou AN, Powis SJ:** Major histocompatibility complex class I-ERp57-tapasin interactions within the peptide-loading complex. *J Biol Chem* 2007 Jun 15; 282(24): 17587-93
- **Schwartz H, Tolley ND, Foulks JM, Denis MM, Risenmay BW, Buerke M, Tilley RE, Rondina MT, Harris EM, Kraiss LW, Mackman N, Zimmerman GA, Weyrich AS:** Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J Exp Med* 2006 Oct; 203(11): 2433-40
- **Siebenlist KR, Mosesson MW, Hernandez I, Bush LA, Di Cera E, Shainoff JR, Di Orio JP, Stojanovic L:** Studies on the basis for the properties of fibrin produced from fibrinogen-containing gamma' chains. *Blood* 2005 Oct; 106(8): 2730-6
- **Sijts EJ, Kloetzel PM:** The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. *Cell Mol Life Sci* 2011 May; 68(9): 1491-502
- **Steward A, Adhya S, Clarke J:** Sequence conservation in Ig-like domains: the role of highly conserved proline residues in the fibronectin type III superfamily. *J Mol Biol* 2002 May; 318(4): 935-40
- **VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R:** Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res.* 2003 Aug 1; 59(2): 277-87
- **Versteeg HH, Ruf W:** Emerging insights in tissue factor-dependent signaling events. *Semin Thromb Hemost* 2006 Feb; 32(1): 24-32
- **Wearsch PA, Cresswell P:** The quality control of MHC class I peptide loading. *Curr Opin Cell Biol* 2008 Dec; 20(6): 624-31

- **Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D:** Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 Apr; 86(8): 2839-43
- **Williams DB:** Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 2006 Feb 15; 119(Pt 4): 615-23
- **Woodruff RS, Sullenger B, Becker RC:** The many faces of the contact pathway and their role in thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* 2011 Jul;32(1): 9-20
- **Wu Y, Ahmad SS, Zhou J, Wang L, Cully MP, Essex DW:** The disulfide isomerase ERp57 mediates platelet aggregation, hemostasis, and thrombosis. *Blood*. 2012 Feb 16; 119(7): 1737-46
- **Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM:** Lipid-protein interactions in blood coagulation. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1376(3): 4

## VIII Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Bernd Engelmann für die Aufnahme in seine Forschungsgruppe, die Betreuung und die Unterstützung in den letzten Jahren.

Herrn Prof. em. Dr. med. Dr. h.c. D. Seidel, Herrn Prof. Dr. med. M. Vogeser und Herrn Prof. Dr. med. D. Teupser danke ich, dass ich die Experimente im Institut für klinische Chemie - dem heutigen Institut für Laboratoriumsmedizin der LMU - durchführen durfte.

Allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe und den Mitarbeitern des Instituts für Laboratoriumsmedizin danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Frau Dr. med. Anna Oberndörfer geb. Beck bedanken, ohne deren unermüdlichem Zuspruch und Motivation diese Arbeit nicht hätte vollendet werden können.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Medizinstudium ermöglicht und immer an mich geglaubt haben.

## **IX Anhang**

### **IX.1 Eidesstattliche Versicherung**

Oberndörfer, Florian Johann

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Stimulierung der Faktor Xa-Bildung und Aktivierung von Tissue Factor durch Proteine des endoplasmatischen Retikulums in vitro

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Hannover, 5. Oktober 2018

Florian Johann Oberndörfer